

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología



**FACTORES DE VIRULENCIA, ASPECTOS  
INMUNOLÓGICOS Y PATRONES DE SENSIBILIDAD  
EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *HELICOBACTER  
PYLORI***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Ángela Somodevilla Solís**

,  
,  
**Madrid, 2012**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología

Factores de virulencia,  
Aspectos Inmunológicos  
y Patrones de  
Sensibilidad en  
Aislamientos Clínicos de  
*Helicobacter pylori*

---

Tesis Doctoral  
Ángela Somodevilla Solís  
Madrid 2012

*Este microbio es como un sacacorchos temido,  
que vive muy bien en el píloro escondido.*

*El ácido corrosivo del estómago puede soportar  
porque fabrica una enzima que lo puede transformar.*

*Durante miles de años este microbio tremebundo  
ha vivido en el estómago de gente de todo el mundo.*

*A las personas una úlcera les puede provocar,  
que, si no se trata, cáncer de estómago puede causar.*

*Los médicos creían que la causa eran los nervios,  
pero ni el bicarbonato ni el psiquiatra servían de remedio.*

Arthur Kornberg Premio Nobel de Medicina

Cuentos de Microbios 2011

## Agradecimientos

El primer paso gracias al cual todo esto se puso en marcha fue el día que elegí el Hospital de La Princesa para hacer mi residencia. Por eso tengo que empezar con un agradecimiento general a todas y cada una de las personas que he encontrado a lo largo de estos años. Todas habéis contribuido de una u otra manera a que hoy esté escribiendo estas líneas.

Gracias **a todos los adjuntos, técnicos y residentes del Servicio de Microbiología** que habéis ido viviendo cada uno de los ensayos a lo largo del tiempo.

Al **Dr. López-Brea** por darme la oportunidad de completar mi formación microbiológica con este proyecto.

A **Teresa**, por darme la oportunidad y el apoyo, por mirarlo todo con buenos ojos y convencerme para que lo hiciera yo, pero sobre todo por no dejar que me rindiera antes de tiempo. Gracias por compartir tardes y fines de semana de experimentos (con sus disgustillos y alegrías) entre donette y donette.

A **Diego**, por su permanente buen humor, los interesantes “debates” y las pacientes explicaciones (aunque algunas acabaran casi en la pila...). Te apunto una de kokotxas. (PD23456788: Esta vez no podrás decir que he sido breve).

A **Sonia**, por enseñarme que la constancia y la buena disposición son las mejores armas para conseguir lo que uno se proponga. Por todos los consejos y tu más que indispensable ayuda. Gracias R mayor por facilitármelo todo tanto.

A todos mis otros **R mayores** por hacer que mis primeros años de residencia y “cacharreos” fueran tan buenos que decidiera meterme en “este lío”.

Por supuesto gracias a mi R mayor “extra”: **Esteban**, empezar siendo tu “secuaz” fue un inicio inmejorable.

A mis increíbles “**R minúsculas**” por su entusiasmo y alegría. Gracias “polluelas” por ser “tan de mi fenotipo”.

## Agradecimientos

A mis co-Rs favoritas, **Ana y Paola**, por estar al tanto de mis avances y saber casi más que yo de este microorganismo.

Por supuesto a todos los que habéis participado activamente en que obtuviera buenos resultados:

**Ventu**, tener de fondo tu estupenda banda sonora ha hecho los tiempos de espera un poco menos eternos. **José Luis**, gracias por pinchar (con aguja y sin ella) con tan buen humor. Mis cocultivos no habrían sido posibles sin tus extracciones. Claro, que tampoco lo habrían sido si **Carolina** no me hubiera ayudado a hacer los cálculos en condiciones... gracias por aquella explicación y por todas las risas y sobremesas de guardia. **Jorge**, gracias a ti también por prestarme la famosa “cámara de contaje” y por tu interés en la evolución de esta tesis. **Cristina, Esther, María Jesús**, queridas serólogas, gracias por vuestros sabios consejos con los ELISAS y con todo lo demás. Trabajar con buena gente siempre es un placer. Y lo mismo puedo deciros a vosotras, **Carmen y Mari Luz**. El buen ambiente es indispensable para hacer un buen trabajo y con vosotras eso está asegurado. A **Bea** y a **Sandra**, por supuesto les agradezco todas las veces que me han guardado las PCRs para que no tuviera que quedarme toda la tarde. Pero sobre todo os agradezco la compañía y la paciencia de las tardes en que si me he quedado, gracias por aguantar mis locuras y poner un poco de calma y cordura en ellas. **Vanessa y Olga**, gracias a vosotras también por las meriendas y risas en las tardes de guardia. Gracias al grupo del **Dr. Atherton**, por acogerme tan bien en Nottingham. Especialmente a **Christian Marx** por su infinita paciencia y sus estupendas explicaciones. También a **Katherine** por preocuparse de que estuviera cómoda en todo momento y por ser mi guía en Cambridge. Mención especial a las personas que habéis hecho de la estadística algo un poco más amigable de lo que parecía a primera vista: **Justo** (gracias por el SPSS y por presentarme al señor Levene) y **Raquel**, sin la que la

## Agradecimientos

redacción del capítulo de resultados habría sido imposible, gracias por la tarde de explicaciones, por no dejarte engañar por mis convincentes (pero no siempre correctas) deducciones y por acompañarme desde que la estadística se cruzó por primera vez en mi camino (¡Menos mal que decidí cambiar el último banco por el tuyo!). Y por último, **María**, muchas gracias por evitar que me desesperara viendo como el PDF descolocaba todo mi trabajo.

Por supuesto no puedo terminar sin dar un gracias ENORME a las personas que me apoyan en todo lo que hago: **mi familia y mis “arturitos”**. Gracias por estar conmigo siempre, por oír mis interminables historias y por ser capaces de recitar hasta del revés las características e importancia del “bichito” que centra esta tesis. Gracias **Bea** por la cita con que comienza este trabajo. **Manu**, gracias por aprender a decir semejante “palabro” casi sin parpadear. Gracias **Marta** por no olvidar nunca la importancia de aquel folio. **Isa**, nadie como tú leyendo códigos de barras, eres la ayudante perfecta. **Alejandro**, gracias por evitar que me dejara las llaves, el busca y hasta la cabeza en cada salida de guardia. **Laura**, gracias por ver el lado positivo de todo y hacérselo ver a los demás. Tus cuentos ilustrados son el mejor resumen de estos años, gracias por la imaginación y cariño que has puesto en ellos. Gracias a mis padres por sobrevivir a todo el proceso tan pacientemente. Gracias **mamá**, por cuidar de que me alimentara bien y rico aunque te preguntará 10 veces que había de cenar la misma noche (ya sabes que ¡¡las neuronas sin azúcar no pueden funcionar!!). Gracias **papá** por revisar cálculos sobre cosas que ni sabías que existían. Gracias **Guille** por leerte los resultados sin protestar, por “arreglar” todo lo que el ordenador “hace solo” y sobre todo por escucharme cena tras cena como buen hermano favorito.

A todos vosotros: GRACIAS.

# **1. ÍNDICE**

# ÍNDICE

<b>1. ÍNDICE.....</b>	<b>Pág. 1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>Pág. 8</b>
<b>2.1 Antecedentes Históricos.....</b>	<b>Pág. 9</b>
<b>2.2 Epidemiología.....</b>	<b>Pág. 12</b>
<b>2.3 Características Microbiológicas.....</b>	<b>Pág. 14</b>
<b>2.4 Características Moleculares:.....</b>	<b>Pág. 16</b>
<b>- Principales genes de virulencia:.....</b>	<b>Pág. 16</b>
❖ <b>Citotoxina Vacuolizante VacA:.....</b>	<b>Pág. 17</b>
➤ <b>Mecanismo.....</b>	<b>Pág. 18</b>
➤ <b>Polimorfismo.....</b>	<b>Pág. 18</b>
❖ <b>Proteína CagA:.....</b>	<b>Pág. 20</b>
➤ <b>Mecanismo.....</b>	<b>Pág. 22</b>
➤ <b>Polimorfismo.....</b>	<b>Pág. 24</b>
❖ <b>Proteína DupA.....</b>	<b>Pág. 26</b>
❖ <b>Adhesinas:.....</b>	<b>Pág. 28</b>
➤ <b>BabA2.....</b>	<b>Pág. 28</b>
➤ <b>HpaA.....</b>	<b>Pág. 28</b>
➤ <b>SabA.....</b>	<b>Pág. 29</b>
➤ <b>OipA.....</b>	<b>Pág. 29</b>
➤ <b>HomB.....</b>	<b>Pág. 29</b>
<b>- Otros factores de virulencia.....</b>	<b>Pág. 30</b>
❖ <b>Enzima ureasa.....</b>	<b>Pág. 30</b>
❖ <b>Flagelos.....</b>	<b>Pág. 30</b>
❖ <b>Sistemas antioxidantes.....</b>	<b>Pág. 31</b>
❖ <b>Lipopolisacárido.....</b>	<b>Pág. 31</b>



## ÍNDICE

❖ Gen <i>jhp0562</i> .....	Pág. 32
- Genes de resistencia a antibióticos.....	Pág. 32
<b>2.5 Clínica.....</b>	<b>Pág. 33</b>
- Enfermedades digestivas.....	Pág. 33
❖ Gastritis.....	Pág. 34
❖ Úlcera péptica.....	Pág. 34
❖ Carcinoma Gástrico.....	Pág. 35
❖ Linfoma Gástrico MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)	Pág. 37
❖ Reflujo gastroesofágico.....	Pág. 37
- Enfermedades extradigestivas.....	Pág. 38
❖ Anemia ferropénica refractaria.....	Pág. 38
❖ Púrpura trombocitopénica idiopática.....	Pág. 39
❖ Retraso en el crecimiento.....	Pág. 39
❖ Otras manifestaciones extradigestivas.....	Pág. 40
<b>2.6 Respuesta Inmune frente a <i>Helicobacter pylori</i>.....</b>	<b>Pág. 41</b>
<b>2.7 Diagnóstico.....</b>	<b>Pág. 43</b>
- Métodos invasivos.....	Pág. 43
❖ Cultivo.....	Pág. 43
❖ Análisis Histológico.....	Pág. 44
❖ Prueba rápida de la ureasa.....	Pág. 45
❖ Métodos moleculares.....	Pág. 45
- Métodos no invasivos.....	Pág. 46
❖ Prueba del aliento.....	Pág. 47
❖ Serología.....	Pág. 47
❖ Detección de Antígeno en heces.....	Pág. 49

## ÍNDICE

❖ Métodos moleculares.....	Pág. 49
<b>2.8 Tratamiento.....</b>	<b>Pág. 50</b>
- Amoxicilina.....	Pág. 52
- Claritromicina.....	Pág. 52
- Metronidazol.....	Pág. 52
- Tetraciclinas.....	Pág. 53
- Quinolonas.....	Pág. 53
- Rifabutina.....	Pág. 53
- Furazolidonas.....	Pág. 53
- Antiácidos.....	Pág. 54
❖ Compuestos de Bismuto.....	Pág. 54
❖ Fármacos antagonistas de receptores de histamina.....	Pág. 54
❖ Inhibidores de la bomba de protones.....	Pág. 54
<b>2.9 Resistencias.....</b>	<b>Pág. 55</b>
- Descripción.....	Pág. 55
❖ Amoxicilina.....	Pág. 55
❖ Claritromicina.....	Pág. 55
❖ Metronidazol.....	Pág. 56
❖ Tetraciclinas.....	Pág. 56
❖ Quinolonas.....	Pág. 57
❖ Rifabutina.....	Pág. 57
❖ Furazolidonas.....	Pág. 57
- Detección de resistencias.....	Pág. 57
❖ Métodos fenotípicos.....	Pág. 58
❖ Métodos genotípicos.....	Pág. 59

## ÍNDICE

<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>Pág. 60</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>Pág. 62</b>
4.1 Selección de biopsias.....	Pág. 63
4.2 Transporte de las muestras.....	Pág. 63
4.3 Procesamiento de las muestras para la identificación y aislamiento de las cepas de <i>H. pylori</i> .....	Pág. 64
4.4 Extracción de ADN a partir de cada cepa.....	Pág. 65
4.5 Estudio fenotípico de la sensibilidad.....	Pág. 66
4.6 Estudio genotípico de la sensibilidad a quinolonas y claritromicina..	Pág. 67
- Extracción de ADN a partir de biopsias.....	Pág. 67
- PCR convencional del ADN extraído.....	Pág. 68
4.7 Detección de genes de virulencia:.....	Pág. 71
- Detección del gen <i>cagA</i> .....	Pág. 71
- Detección del gen <i>vac</i> .....	Pág. 73
- Detección de genes <i>dupA</i> .....	Pág. 75
- Detección del gen <i>homA</i> y <i>homB</i> .....	Pág. 79
- Detección de genes <i>jhp0562</i> y <i>jhp0563</i> .....	Pág. 81
4.8 Cuantificación de IL-12 liberada por células mononucleares de sangre periférica.....	Pág. 83
4.9 Análisis estadístico.....	Pág. 84
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>Pág. 89</b>
5.1 Datos generales de los pacientes estudiados.....	Pág. 90
5.2 Factores de virulencia analizados:.....	Pág. 94
- Clásicos:.....	Pág. 94
❖ Gen <i>vacA</i> .....	Pág. 96

## ÍNDICE

❖ Gen <i>cagA</i> .....	Pág. 103
❖ Relación de entre <i>vacA</i> y <i>cagA</i> .....	Pág. 106
- Otros factores de virulencia:.....	Pág. 108
❖ Gen <i>dupA</i> .....	Pág. 109
❖ Gen <i>homB</i> .....	Pág. 114
❖ Gen <i>jhp0562</i> .....	Pág. 118
- Relación entre todos los factores de virulencia analizados.....	Pág. 123
<b>5.3. Producción de IL-12:.....</b>	<b>Pág. 129</b>
- Resultados del cocultivo .....	Pág. 129
- Influencia de los donantes.....	Pág. 134
- Influencia de las características propias del paciente.....	Pág. 135
- Relación de la producción de IL-12 y los factores de virulencia.....	Pág. 136
- Relación de la producción IL-12 y la clínica desarrollada.....	Pág. 138
<b>5.4 Resistencia antibiótica:.....</b>	<b>Pág. 140</b>
- Datos de sensibilidad antibiótica.....	Pág. 140
- Análisis de la resistencia observada.....	Pág. 142
- Determinación genotípica de mutaciones de resistencia a claritromicina y quinolonas.....	Pág. 144
- Relación entre la resistencia, factores propios del paciente y la clínica desarrollada.....	Pág. 147
- Relación entre la resistencia y los factores de virulencia analizados...	Pág. 151
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>Pág. 158</b>
<b>6.1 Prevalencia y distribución de factores de virulencia analizados.....</b>	<b>Pág. 160</b>
- Gen <i>vacA</i> .....	Pág. 160
- Gen <i>cagA</i> .....	Pág. 161

## ÍNDICE

- Relación de genes <i>vacA</i> y <i>cagA</i> .....	Pág. 163
- Gen <i>dupA</i> .....	Pág. 164
- Gen <i>homB</i> .....	Pág. 167
- Gen <i>jhp0562</i> .....	Pág. 168
<b>6.2 Interrelación de los factores de virulencia analizados.....</b>	<b>Pág. 169</b>
<b>6.3 Cuantificación de la producción de IL-12 tras cocultivo y su relación con los factores de virulencia analizados.....</b>	<b>Pág. 170</b>
<b>6.4 Patrones de sensibilidad, métodos de detección y relación con los factores de virulencia analizados:.....</b>	<b>Pág. 173</b>
- Patrones de sensibilidad.....	Pág. 173
- Determinación genotípica de mutaciones de resistencia para claritromicina y fluorquinolonas.....	Pág. 175
- Relación entre la resistencia, factores propios del paciente y la clínica desarrollada.....	Pág. 178
- Relación entre la resistencia y los factores de virulencia analizados...	Pág. 180
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>Pág. 182</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>Pág. 185</b>

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS:**

*Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo con forma en espiral (característica morfológica de la que deriva el nombre *Helicobacter*) que vive en el estómago humano, siendo uno de los escasos microorganismos conocidos capaces de subsistir en un ambiente tan extremadamente ácido.

Inicialmente fue denominado *Campylobacter pyloridis*, término que tuvo que ser corregido posteriormente como *C. pylori* de acuerdo con una correcta gramática latina (*pylori* como genitivo de *pylorus*)<sup>1</sup>. Sin embargo, tras la secuenciación de la región 16S del RNA ribosómico en 1989, se demostró que esta especie era distinta a las especies de *Campylobacter* descritas hasta entonces y fue reclasificado dentro de su propio género: *Helicobacter*<sup>2</sup>. El nombre “*pylori*” procede del término latino *pylorus*, que significa "guardabarrera" y hace referencia al píloro como separación entre estómago y duodeno.

*H. pylori* infecta de manera crónica a más del 50% de la población mundial<sup>3</sup> produciendo en la mayoría de los casos gastritis subclínicas. Pero es también la primera causa de patologías más graves como las úlceras gástricas o duodenales (desarrolladas en alrededor de un 20% de los pacientes)<sup>4</sup> y la segunda causa mundial de muerte por cáncer (produce adenocarcinomas gástricos en menos del 1% de los infectados)<sup>5</sup>.

La colonización del ser humano por este microorganismo se remonta, al menos, a 50.000 años atrás y probablemente lo ha acompañado a lo largo de su evolución, colonizándole en la infancia, adaptándose a él y persistiendo a lo largo de su vida<sup>6</sup>. A pesar de ello, la primera vez que se describe la presencia de microorganismos en un medio tan hostil como el estómago es en el siglo XIX, cuando investigadores como Rappin<sup>7</sup> y Bizzozero<sup>8</sup> los observan en estómagos de perros y gatos. Después siguen años de gran controversia a favor y en contra de la existencia y permanencia real de microorganismos en la mucosa gástrica y su posible relación con algún tipo de

## INTRODUCCIÓN

patología. Así, Salomon es el primero que consigue visualizar en 1886 microorganismos en estómagos humanos<sup>9</sup>, mientras que el profesor Walery Jaworski es el primero en sugerir en 1889 una posible relación entre los microorganismos curvados que observa (a los que entonces denominó *Vibrio rugula*) y algunas patologías gástricas. Su trabajo fue incluido en el *Handbook of Gastric Diseases*, pero tuvo poco impacto ya que estaba escrito en polaco<sup>10</sup>. Ya en el siglo XX, Doenges lleva a cabo el primer estudio sistemático en busca de las bacterias helicoidales en estómagos humanos<sup>11</sup> y sale a la luz la primera publicación relacionando estos microorganismos con las úlceras gástricas<sup>12</sup>. A pesar de todas estas evidencias, parece que la comunidad científica se pone de acuerdo en 1954, tras las investigaciones de Palmer con más de mil biopsias<sup>13</sup>, en que el estómago es un medio estéril en el que ningún microorganismo puede sobrevivir y por tanto tampoco ser el causante de ninguna patología. Es probable que los resultados negativos obtenidos se debieran a que las biopsias no fueran tomadas del antro gástrico y a la dificultad para visualizar este microorganismo. Desde ese momento parece claro que las causas de enfermedades como las úlceras pépticas estaban únicamente relacionadas con factores como las comidas picantes o el estrés de la vida moderna. Pasan de esta forma más de 20 años hasta que en 1975, Steer y Colin Jones observan de nuevo, gracias a la microscopía electrónica, microorganismos espirales asociados a respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica de pacientes con úlcera<sup>14</sup>. Seis años más tarde, en 1981 los australianos Marshall y Warren comienzan en Perth un estudio prospectivo, con el que buscan cultivar por primera vez este microorganismo. Para ello siguen la metodología utilizada por Skirrow en el cultivo de *Campylobacter*<sup>15</sup>, dadas sus similitudes morfológicas. Los primeros intentos fueron fallidos porque *H. pylori* necesita mayores tiempos de incubación, pero durante las vacaciones de Semana Santa de 1982, al pasar accidentalmente 7 días en la estufa, consiguen el primer



## INTRODUCCIÓN

aislamiento de este microorganismo<sup>16</sup>. Aún así la comunidad científica se mantiene escéptica cierto tiempo, durante el cual varios grupos de investigación verifican la asociación de *H. pylori* con gastritis y lesiones ulcerosas<sup>17</sup>. Para demostrar que *H. pylori* es el verdadero causante de la gastritis y no un mero colonizador, Marshall ingiere él mismo este microorganismo, lo que al cabo de unos días le provoca náuseas y vómitos y mediante endoscopia se revelan signos de gastritis y la presencia de *H. pylori*. Marshall y Warren continúan sus investigaciones para demostrar por primera vez que, al ser un microorganismo la causa principal de las gastritis, el uso de antibióticos contra el mismo es un tratamiento eficaz en la mayoría de casos, lo que supone un giro de 180 grados en el manejo de este tipo de pacientes. En 1987 el gastroenterólogo Thomas Borody describe la primera terapia triple para el tratamiento de la úlcera duodenal<sup>18</sup>. Todos estos hechos hacen que en 1994<sup>19</sup> el National Institute of Health asocie *H. pylori* con la úlcera péptica y recomiende su tratamiento antibiótico erradicador y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo incluya como agente carcinógeno tipo 1 asociándolo con el cáncer gástrico. En 2005 ambos investigadores reciben el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de *Helicobacter pylori* y su papel infeccioso en la gastritis y úlcera péptica<sup>20</sup>.

### **2.2 EPIDEMIOLOGÍA**

El hábitat específico de *H. pylori* es la mucosa gástrica del hombre aunque pueden existir otros reservorios animales como primates, y gatos domésticos <sup>21</sup>. El agua no clorada también ha sido descrita por algunos autores como reservorio natural y posible medio de transmisión del microorganismo <sup>22</sup>.

La infección por *H. pylori* se produce en todas las regiones del mundo, de forma que alrededor de un 50% de la población está colonizada <sup>1</sup>. Sin embargo, sólo entre un 10% y un 15% de los individuos infectados sufrirán *ulcus* peptídico y hasta un 1-3% desarrollarán cáncer gástrico. No se conoce con exactitud el mecanismo de transmisión pero se cree que probablemente se deba al contacto interpersonal (oral-oral, oral-fecal) ya que la edad<sup>23</sup>, el nivel de desarrollo de la zona y factores socioeconómicos individuales parecen influir claramente en la adquisición del microorganismo<sup>24, 25</sup>:

- Se ha descrito la infancia como la edad en la que se adquiere con mayor frecuencia el microorganismo aunque existen diferencias entre los países industrializados y en vías de desarrollo: en los primeros la seroprevalencia en la niñez es baja y se va incrementando con la edad y en los últimos la infección se produce con una tasa elevada durante la infancia. .
- En países en vías de desarrollo, en los que la falta de estructura sanitaria y el hacinamiento facilitan la transmisión, las tasas de prevalencia tanto en niños como en adultos son más elevadas que en países industrializados <sup>26</sup>.

Al mismo tiempo, se ha comprobado que existe una importante variabilidad genética que también tiende a organizarse geográficamente:

En primer lugar, parece demostrado que esta variabilidad es menos acusada cuanto menor es la distancia geográfica con África Oriental, lugar donde se supone surgió el hombre moderno y donde probablemente se dieron las primeras colonizaciones por

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori*. A partir de entonces, y coincidiendo con las migraciones desde África al resto del mundo hace alrededor de 58 000 años, comenzaría la coexistencia y evolución de ambas especies que se verían sometidas a las distintas presiones del medio y condiciones que las rodeaban<sup>27</sup>. En el año 2003 la revista Science publica un estudio basado en resultados obtenidos mediante MLST de 370 cepas procedentes de distintas partes del mundo, en el que los autores son capaces de distinguir hasta 7 poblaciones distintas que concuerdan con estas migraciones del ser humano desde el continente africano al resto del mundo<sup>28</sup>.

En segundo lugar, diversos estudios confirman la distinta incidencia de las diversas patologías causadas por *Helicobacter pylori* según el área geográfica estudiada. Por ejemplo, la incidencia del adenocarcinoma gástrico es mucho más elevada en Asia Oriental, Centro y Sudamérica que en otros lugares del mundo<sup>29</sup>, coincidiendo con el hecho de que también en estas áreas la presencia de determinados factores de virulencia como la isla de patogenicidad cagA es mucho más prevalente (alrededor del 90%<sup>30,31,32,33</sup>) frente al 40-60% de otras regiones<sup>34</sup>.

## **2.3 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS:**

### **2. 3. 1) Microscópicamente:**

Se trata de un bacilo Gram negativo en espiral de un tamaño que oscila entre 0,5 y 1 micrómetro de ancho y 2,5 y 5 micrómetros de largo. Si se realiza una extensión a partir de colonia, el microorganismo presenta una morfología algo más recta y en el caso de proceder de cultivos viejos pueden incluso observarse formas cocoides.

Presenta asimismo entre 4 y 8 flagelos polares envueltos por una vaina que se prolonga desde la membrana externa de la pared celular. Estos flagelos son los encargados de proporcionar al microorganismo su movilidad en “sacacorchos”.

### **2. 3. 2) Macroscópicamente (Cultivo):**

*H. pylori* es un microorganismo muy exigente que requiere unas condiciones específicas para ser cultivado:

- Es capaz de crecer en medios no selectivos siempre que tengan sangre o derivados de esta.
- Existen medios que además contienen antibióticos y antifúngicos para evitar que se produzca la colonización del cultivo por agentes contaminantes que frecuentemente dificultan la viabilidad de la bacteria.
- La incubación del medio elegido debe realizarse en una atmósfera microaerofílica (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>).
- La temperatura de incubación debe ser de 35 °C.
- El tiempo mínimo de incubación es de 5 a 10 días.

Manteniendo estas condiciones se observará el crecimiento de colonias pequeñas y translúcidas características de *H. pylori*.

## INTRODUCCIÓN

### **2. 3. 3) Bioquímicamente:**

Además de la observación micro y macroscópica, son pruebas características que ayudan a la identificación final del microorganismo las reacciones de:

- La catalasa
- La oxidasa
- La ureasa

Todas ellas positivas.

### **2.4 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES:**

Actualmente se han secuenciado completamente distintas cepas de *H. pylori*<sup>5</sup>, lo que ha permitido conocer que su genoma se encuentra estructurado en un solo cromosoma circular de entre 1,5-1,8 Mb y alrededor de 1590 secuencias codificadoras<sup>35</sup>.

La diversidad genética entre cepas se debe a la gran capacidad que posee este microorganismo para mutar, transformarse y recombinarse con otras cepas, variantes clonales o incluso otras especies<sup>36,37,38</sup>. Ejemplos de estas capacidades incluyen el intercambio de alelos de genes de virulencia como *cagA*, la pérdida de una parte de ellos como en ocasiones ocurre con la isla de patogenicidad *cagA* o la recombinación con otras cepas provocando un cambio fenotípico en la expresión de proteínas como VacA<sup>39</sup>.

Es posible que algunas cepas mutantes sobrevivan en el estómago de un individuo, actuando como reservorio de elementos genéticos para las demás bacterias con las que cohabita y seleccionándose el clon dominante según la presión que ejerza el medio<sup>5,40</sup>.

De esta forma, incluso una única cepa puede generar múltiples variantes y seleccionarse aquellas que mejor se adaptan al hospedador y al medio durante la colonización a largo plazo<sup>41</sup>.

Por otro lado, al mismo tiempo que esta elevada diversidad genética facilita su recombinación y mutación para sobrevivir en medios hostiles, también le permite desarrollar resistencias frente a antibióticos comúnmente utilizados en la clínica.

#### **2. 4. 1) Principales genes de virulencia:**

Los genes de virulencia se clasifican generalmente en tres categorías:

- **Los genes específicos de cepa:**

Es decir, aquellos que pueden estar presentes o no en cada cepa.

## INTRODUCCIÓN

Son ejemplos la isla de patogenicidad *CagA* (PAI) y los genes presentes en la región de elevada plasticidad.

- **Los genes de fase variable:**

Aquellos que están siempre presentes pero cuyo estatus puede cambiar durante el crecimiento o en diferentes condiciones.

(*OipA*, *sabA*, *sabB*, *babB*, *bac C* y *hopZ*)

- **Los genes con distintas estructuras:** también denominados genes mosaico.

Aquellos que presentan estructuras variables que determinan distintos fenotipos

El gen *vacA*, regiones de repetición del gen *cagA* o los genes *alpAB* presentan estas características.

La importancia de las distintas formas de expresión y la presencia o no de estos genes se describe a continuación.

### **2.4.1.1 Citotoxina Vacuolizante VacA:**

Es una proteína codificada por el gen *vacA* que induce la vacuolización y posterior destrucción de las células epiteliales gástricas.

El gen se encuentra presente en todas las cepas y aunque casi todas producen la proteína VacA<sup>42,43</sup>, menos del 50% expresa la citotoxina en su forma más activa: una exotoxina compuesta por dos subunidades (p33 y p55) implicadas en la acción tóxica e interacción con la membrana respectivamente<sup>44,45</sup>.

VacA está específicamente adaptada al pH ácido del estómago<sup>46</sup> donde se une a un receptor tirosinofosfatasa (necesario para que induzca la formación de ulcera gástrica según los datos obtenidos en estudios con ratones transgénicos<sup>47</sup>), para ser introducida en el citosol que es su lugar de acción<sup>48,49,50</sup>.

## INTRODUCCIÓN

### **a) Mecanismo de acción de la proteína VacA:**

El mecanismo exacto por el que se produce la vacuolización no está totalmente descrito pero se sabe que implica alteraciones en la membrana que afectan a la vía endosomal-lisosomal y formación de canales selectivos de iones en esa misma membrana<sup>51,52,53,54</sup>.

Por otro lado, la proteína VacA, además de desencadenar la vacuolización celular, interfiere en la presentación de antígeno<sup>55</sup>, aumenta la permeabilidad de capas epiteliales polarizadas<sup>56</sup> e induce apoptosis mediante la liberación de citocromo C y de las caspasas de las mitocondrias<sup>57,58,59</sup>. Además, *VacA* amplifica la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica aumentando la expresión de ciclooxigenasa 2, en las células T, neutrófilos y macrófagos, que a su vez pueden activar la producción del factor de crecimiento vascular endotelial y provocar el desarrollo de procesos tumorgénicos. Aunque no están perfectamente definidos los mecanismos por los que la respuesta inmune inducida por *H. pylori* contribuye a la carcinogénesis gástrica, la sobreexpresión de COX-2 y el aumento de citoquinas proinflamatorias originan alteraciones morfológicas que pueden llevar al desarrollo de gastritis atróficas y metaplasia intestinal<sup>60</sup>. Al mismo tiempo, interrumpe la maduración de los fagosomas en los macrófagos, por lo que la bacteria sobrevive dentro de los mismos<sup>61</sup>.

### **b) Polimorfismo:**

Aun cuando el 80% poseen un gen funcional, el efecto citotóxico sólo se detecta en un 50% de la población<sup>62</sup>. La diferente toxicidad de esta proteína se asocia a que el gen *vacA* posee una estructura mosaico que le permite varias posibles formas de presentación: Se pueden distinguir 2 familias (*s1* y *s2*) en base al análisis de la secuencia del extremo 5' del gen (codifica la región señal N-terminal de la proteína) y otras 2 familias adicionales (*m1* y *m2*) analizando la región media que codifica parte de la subunidad de unión a células epiteliales p55<sup>30,63</sup>. Recientemente, ha sido descrita una



## INTRODUCCIÓN

nueva región intermedia (tipo *i1* o *i2*) con actividad reguladora, así como varias subfamilias *s1* (*a*, *b* y *c*), *m1* y *m2*<sup>64</sup>.

Todas las combinaciones entre las 3 regiones son posibles. El mecanismo por el que las distintas formas predispone a las distintas enfermedades no se ha descrito<sup>5</sup> pero sí la relación entre cada una de ellas:

### b.1 Región señal (*s*):

Numerosos estudios<sup>30,31,64,65,66,67,68</sup> describen que el desarrollo de úlcera péptica es más frecuente en pacientes con *H. pylori* que presenta el tipo *s1* frente a los que presentan el *s2*, aunque este hecho se mantiene en menor medida en países Orientales<sup>69</sup>. Algunos estudios sugieren que el tipo *vacA s2* sea relativamente no citotóxico<sup>70</sup> o incluso que sea capaz de disminuir la capacidad de la proteína para formar canales en la membrana celular<sup>71</sup>.

### b.2 Región media (*m*):

Codifica un fragmento de la subunidad de unión p55<sup>62</sup>. La diferencia entre ambos tipos de proteína (*m1* y *m2*) son alrededor de 30 aminoácidos incluidos en esta región<sup>30,42</sup>.

El tipo *m1* ha sido asociado a un mayor daño epitelial que el tipo *m2* en ensayos con determinadas líneas celulares<sup>72</sup>. Sin embargo otros estudios demuestran que las cepas *m2* pueden ser igualmente tóxicas, con la excepción de la línea celular HeLa con la que tiene dificultades de interacción. Probablemente, las distintas formas de la toxina posean diferentes dominios de unión<sup>42</sup>, siendo la codificada por el tipo *m1* la que se asocia con vacuolización en una mayor variedad de células<sup>61</sup>, pero teniendo en cuenta que la región media parece tener una implicación más importante en la interacción con las células gástricas que con la acción tóxica propiamente dicha<sup>73</sup>.

Se han encontrado híbridos *m1m2* (*m1* proximal, *m2* distal) en los que la capacidad de vacuolización parece similar a las cepas *m1*<sup>44</sup>.

## INTRODUCCIÓN

### b.3 Combinaciones *s/m*:

Todas las combinaciones son posibles, aunque la combinación *s2m1* es poco frecuente.

El genotipo *s1m1* se asocia con patologías más graves: úlcera<sup>74</sup> y cáncer gástrico<sup>30</sup>.

Mientras que las cepas con el alelo *m2* suelen presentar baja asociación con estas patologías, especialmente *s2m2*. Sin embargo, la forma *s1m2*<sup>75</sup> ha sido descrita en casos de úlcera péptica y el alelo *m2* es muy prevalente en China donde la úlcera y el cáncer gástricos son frecuentes.

### b.4 Región intermedia (*i*):

Se encuentra entre la región *s* y la *m* y cumple una función reguladora. En base a su secuencia aminoacídica se han descrito dos fenotipos, *i1* e *i2*. Algunos estudios realizados en Irán<sup>63</sup> sugieren que las cepas *s1m1* (las más virulentas) suelen ser *i1*, mientras que las *s2m2* (las menos virulentas) suelen ser *i2*. Además encuentran que, en el caso de la combinación *s1m2*, la presencia de *i1* se relaciona con mayor citotoxicidad y la de *i2* con ausencia de ella. Además, parece que las cepas *i1* son frecuentes en China y Japón donde la prevalencia de cáncer gástrico es elevada<sup>5</sup>. Esto indicaría la capacidad reguladora y predictora de patogenicidad de la región intermedia, aunque son necesarios más estudios que lo confirmen.

#### **2.4.1.2 Proteína CagA:**

Esta proteína antigénica (*citotoxin- associated gen A protein*), es uno de los factores de virulencia de *H. pylori* más extensamente estudiados. El gen que la codifica, el gen *cagA*, no está presente en su forma completa en todas las cepas de *H. pylori*, lo que permite dividir este microorganismo en dos subpoblaciones diferenciadas en función de la producción o no de la proteína. Este hecho resulta de suma relevancia desde un punto de vista patológico, ya que las cepas CagA positivas se relacionan, al menos en países

## INTRODUCCIÓN

con una prevalencia moderada<sup>76</sup> con el desarrollo de una sintomatología más grave en forma de gastritis severa, atrofia de la mucosa o alto riesgo de úlcera o cáncer gástrico<sup>77</sup>. Su distribución parece seguir también un patrón geográfico de forma que alrededor de un 60% de las cepas de origen occidental (Europa, América y Australia) son portadoras de este gen así como la prácticamente la totalidad de las de origen oriental<sup>41</sup>.

Fue descrita por primera vez en 1990 en el laboratorio de Martin Blaiser<sup>37</sup> pero fueron estudios posteriores los que determinaron que el gen *cagA* se encuentra en realidad englobado en una estructura más compleja: la isla de patogenicidad *cagA* (*cagA* PAI), una inserción de 40 kb de ADN que engloban 32 genes flanqueados por 31 pares de bases “direct repeat”. Dada la gran capacidad de *H. pylori* para modificar su genoma, se piensa que dicho fragmento fuera adquirido por transmisión horizontal a partir de un antecesor de momento desconocido e integrado en el gen cromosómico de la glutamato racemasa<sup>33</sup>. Así, la detección del gen *cagA* permite utilizar su presencia como marcador de la *cagA* PAI. El mayor avance se produjo años después cuando se comprobó que esta isla de patogenicidad codifica un sistema de secreción tipo IV (SST4) que es el encargado de inyectar la proteína CagA, el peptidoglicano y posiblemente otras sustancias en el interior de las células hospedadoras<sup>68,78</sup>. Los SST4 son un amplio grupo de complejos sistemas transportadores descritos en bacterias Gram negativas, relacionadas ancestralmente con sistemas de conjugación, y para los cuales, el descrito en *Agrobacterium tumefaciens* (oncobacteria que afecta a células vegetales), es el prototipo de referencia. Se estructura en:

- Un canal de translocación de envoltura celular
- ATPasas citoplasmáticas
- Un pilus

## INTRODUCCIÓN

Estas estructuras están compuestas por 11 proteínas VirB y una proteína VirD4 (una NTPasa) que desempeñan distintas funciones dentro del sistema: estructurales (VirB6-10), energéticas (VirD4, VirB4 y VirB11) y asociadas al pilus de inyección (VirB2 y probablemente VirB3 y 5).

Los componentes descritos en *cagA* PAI son<sup>3</sup>:

- Proteína CagC (VirB2) que es el componente principal del pilus.
- Proteína CagY (VirB10) que recubre el pilus y cumple funciones estructurales.
- Proteína CagT (VirB7) y W (VirB9) que forman parte de la base del pilus<sup>79</sup>.
- Proteína CagL que recubre el extremo del pilus y actúa como adhesina entre él y la célula diana.
- Proteína CagF, es una chaperona que se une a la región señal de la proteína CagA y es fundamental para su translocación.
- Proteína CagE cuyo gen se ha sugerido como marcador más preciso de una *cagA* PAI intacta<sup>80</sup>.
- Proteína CagA propiamente dicha.

### **a) Mecanismo de acción de la proteína CagA:**

*H. pylori* se une a la célula diana e inyecta la proteína CagA en su interior. Una vez en el interior busca la cara interna de la membrana celular que es donde va a tener lugar la fosforilación<sup>78</sup>. Las proteínas encargadas de ello son de la familia de las Src quinasas (c-Src, Fyn, Lyn, Yes...) <sup>81,82</sup> y las regiones que van a ser fosforiladas son unas secuencias específicas de aminoácidos: glutamato (E), prolina (P), isoleucina (I), tirosina (Y), alanina (A) denominadas “EPIYA motifs”. Esta fosforilación ocurre directamente sin ningún estímulo previo lo que probablemente indica que estas quinasas son activas constitutivamente en las células epiteliales de la mucosa gástrica.

## INTRODUCCIÓN

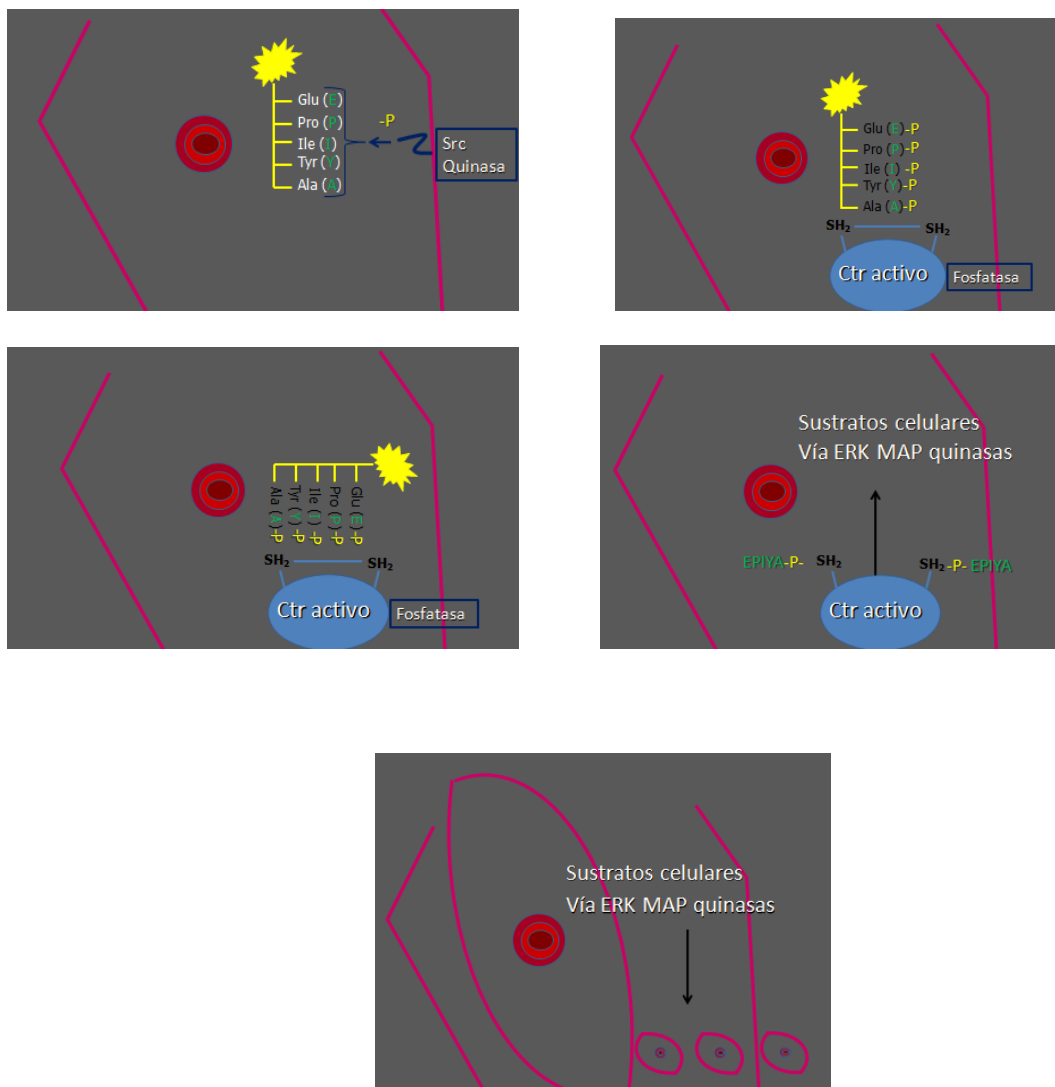
Una vez fosforilada la proteína CagA interacciona con una tirosinfosfatasa, la proteína SHP-2<sup>83,84</sup>. Esta proteína contiene dos dominios SH<sub>2</sub> que normalmente se encuentran unidos al centro catalítico de la enzima. Al interaccionar con la proteína CagA fosforilada, las secuencias EPIYA se unen a los dominios SH<sub>2</sub> activando así su actividad fosfatasa (Figura 2.4.1). Así por un lado, son desfosforilados sustratos celulares que inducen un fenotipo celular alargado y un importante reordenamiento del citoesqueleto (*hummingbird cells*)<sup>85</sup> y por otro, potencian la activación mantenida de la vía fisiológica de ERK MAP quinasas, vía que regula tanto el crecimiento celular (por lo que se considera el gen *cagA* un gen oncogénico) como su morfología, contribuyendo al aumento de células con el fenotipo *hummingbird*.

Aunque CagA activa vías fisiológicas humanas no se ha encontrado similitud con ninguna proteína de mamíferos conocida. Pero si se ha relacionado la activación prolongada de estas vías con un importante papel en la progresión de fase G1 a S, por lo que CagA podría estar implicada en una mayor predisposición de la célula gástrica a descontrolar su crecimiento<sup>86</sup>. Estos mecanismos conllevan una grave alteración y daño en el hospedador, por lo que *H. pylori* ha desarrollado un mecanismo feed-back que controla su acción para mantener un cierto equilibrio: la proteína Cag fosforilada, además de unirse a la fosfatasa SHP-2 puede interaccionar con los dominios SH<sub>2</sub> de las Src quinasas, que fosforila las proteínas Src impidiendo así que puedan seguir activando a más proteína CagA<sup>87</sup>.

Además de estos efectos regulados por la fosforilación, la proteína CagA puede por vías independientes, activar otras vías (interaccionando por ejemplo con Grb2 o c-Met)<sup>88</sup>, alterar la unión celular de la mucosa gástrica (interaccionando con ZO-1)<sup>89</sup> o bien la regulación de ciertos factores de transcripción entre los que se encuentran el factor

## INTRODUCCIÓN

nuclear kappaB<sup>90</sup> que induce la producción de IL-8 (también inducido por el peptidoglicano inyectado por el SST4 codificado por *cagA* PAI)<sup>91</sup>.



**Figura 2.4.1:** Mecanismo de acción proteína CagA

### b) Polimorfismo:

A pesar de que la ausencia del gen *cagA* se relaciona con un menor riesgo de manifestaciones gástricas graves, la incidencia entre las CagA positivas no es uniforme.

Esto se explica, al menos en parte, gracias a la estructura polimórfica de esta proteína.

## INTRODUCCIÓN

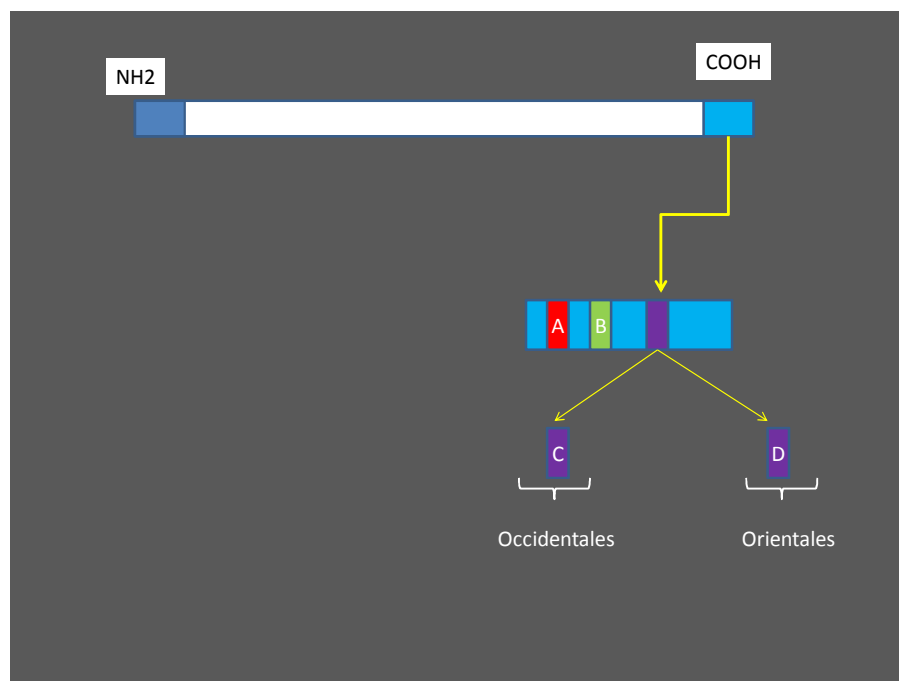
Como se describió previamente, existen unas secuencias específicas de aminoácidos, los “EPIYA motifs”, que están siempre presentes en la proteína activa y que son los que van a ser fosforilados al comienzo de la cascada de acción de la proteína. Estas secuencias se encuentran en número múltiple en la región C-terminal de la proteína, y pueden estar flanqueados por cuatro segmentos aminoacídicos distintos en base a los cuales se distinguen 4 tipos distintos de “EPIYA motifs” (Figura 2.4.2):

EPIYA- A cuando lo acompaña una secuencia determinada de 32 aminoácidos

EPIYA- B cuando lo acompaña una secuencia determinada de 40 aminoácidos

EPIYA-C cuando lo acompaña una secuencia determinada de 34 aminoácidos

EPIYA- D secuencia que es única en cepas del Este Asiático



**Figura 2.4.2:** Polimorfismo de proteína CagA

En las cepas de origen Occidental, encontramos habitualmente una copia de EPIYA- A, otra de B y al menos una de C, aunque es frecuente que esta región se repita hasta 3 veces. La secuencia C es, además, la que constituye un mejor lugar de fosforilación por las SKC y un mayor número de repeticiones del mismo se relaciona con un mayor

## INTRODUCCIÓN

riesgo de cáncer gástrico. Sin embargo, en las cepas de origen asiático esta secuencia suele estar sustituida por la denominada EPIYA- D. Esta secuencia parece tener una mayor unión con la proteína quinasa, permitiéndole producir mayores niveles de inflamación, gastritis y atrofia<sup>41,90,92</sup>. Esto podría explicar porque, por ejemplo, la tasa de cáncer gástrico en Asia del Este es mayor que en África aunque la prevalencia de individuos *H. pylori* es igualmente elevada<sup>5</sup>.

### **2.4.1.3 Proteína DupA:**

Comparando los genomas de dos cepas que han sido completamente secuenciadas (TIGR 26695 y J99), se observa que existen regiones con un contenido de G+C significativamente mayor que el resto del genoma, sugiriendo que se trate probablemente de ADN adquirido<sup>93</sup>. Una de estas regiones es la llamada “región plástica”, en la que se encuentran casi la mitad de los genes específicos de cepa de *H. pylori* y que en la actualidad está siendo objeto de gran interés. Ejemplos de estos genes son *jhp0940* y *jhp0947* (según un estudio realizado por Occhialini et al en Costa Rica, parecen estar relacionados con el cáncer gástrico<sup>94</sup>) o un nuevo segmento descrito por Kersulyte et al (*tfs3*) homólogo a los genes que codifican sistemas de secreción tipo 4 (SST4)<sup>95</sup>. Los SST4 más estudiados en *H. pylori* son la Isla de patogenicidad CagA y el sistema de transporte de ADN vía transformación natural (sistema ComB) descrito en todas las cepas de *H. pylori*<sup>3</sup>.

Recientemente, Hong Lu et al han descrito otros dos genes, **jhp0917** y **jhp0918**, ambos homólogos a genes **VirB4**, que están presentes en la región plástica. El gen *jhp0917* codifica una proteína de 475 aminoácidos a la que le falta la región C-terminal de VirB4. Mientras que el gen *jhp0918* codifica un producto de 140 aminoácidos que es homólogo a la región que falta de VirB4. Por eso suponen que ambos genes forman normalmente un gen continuo con excepción de la cepa J99 en el que este gen estaría



## INTRODUCCIÓN

interrumpido. El conjunto de ambos se ha denominado **Duodenal Ulcer Promoting gen** (*dupA* gen) debido a que en 2005, Lu et al, describieron su función como marcador para el desarrollo de úlcera duodenal y como protector frente al cáncer gástrico en pacientes de Japón, Corea y Colombia. Según sus resultados esta relación era constante tanto en cepas asiáticas como occidentales. Asimismo observaron que, cuando las cepas eran positivas para *jhp0918*, sólo un 2% no lo eran también para *jhp0917*<sup>96</sup>.

La gran novedad frente al resto de factores de virulencia es que todos ellos han sido asociados con un mayor o menor riesgo de padecer distintas enfermedades graves, pero esta sería la primera vez que se asocie un gen con una patología concreta: la úlcera duodenal. Según sus resultados, la presencia de los genes *jhp0917* y *jhp0918* sería prevalente entre pacientes con úlcera duodenal (42%)<sup>97</sup>.

Estudios posteriores han obtenido resultados discrepantes en función de la zona geográfica<sup>4,98</sup>, de la edad<sup>96</sup> y recientemente, de la secuencia del propio gen. Esta última posibilidad sugiere el polimorfismo de *dupA* como causa de que su presencia se relacione directamente con la úlcera duodenal en algunos casos y no en otros. La forma denominada *dupA1* sería la más patológica<sup>99,100</sup>.

Por otro lado, de momento tampoco se conoce la función de la proteína DupA propiamente dicha. Pero sí que el gen que la codifica presenta similitudes con proteínas esenciales en procesos de transferencia de ADN y división celular y, lo que resulta aún más importante, con homólogos de ATPasas VirB4<sup>96</sup>. Este último hecho abre la posibilidad de que el gen *dupA* pudiera estar englobado en una unidad mayor, similar a la Isla de patogenicidad CagA, cuya estructura correspondiese a un sistema SST4 aún sin caracterizar<sup>97</sup>.

Estudios sobre la proteína DupA y el papel de los genes de la región plástica están de momento en los primeros pasos y constituyen un claro objetivo para el futuro.

## INTRODUCCIÓN

### **2.4.1.4 Adhesinas:**

La adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica se realiza mediante la unión de diversas adhesinas a distintos receptores presentes en las células epiteliales de la misma<sup>101</sup>.

Entre ellas destacan:

#### **a) BabA2:**

Blood Antigen Binding adhesión 2, es una proteína que reconoce epítomos de los denominados antígenos de Lewis. Estos antígenos han sido descritos en eritrocitos pero también son expresados por las células epiteliales humanas, incluidas las gástricas que constituyen la diana de esta adhesina.

Está codificada por los genes *babA1* y *babA2* aunque sólo el gen *babA2* es funcionalmente activo. La expresión de esta proteína, que puede ser regulada por las condiciones del medio: se asocia con la puesta en marcha de una respuesta inmune inespecífica y la producción de autoanticuerpos que contribuyen con la gastritis crónica por pérdida de células parietales<sup>102</sup>. En modelos animales parece además inducir mayores niveles de IL-8<sup>31</sup>.

La adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica permite la salida e interacción de otros factores de virulencia<sup>103</sup>.

#### **b) HpaA:**

*Helicobacter pylori adhesin A* es una proteína de superficie de *H.pylori* que interacciona con conjugados glicosilados con ácido siálico presente en la superficie de las células epiteliales gástricas y en la de neutrófilos. Está codificada por el gen *hpaA*. Actúa como antígeno frente al cual el cuerpo humano es capaz de producir anticuerpos por lo que es utilizado en ensayos serológicos y de búsqueda de vacunas<sup>104</sup>.

## INTRODUCCIÓN

### c) **SabA:**

Sialic acid binding adhesion se ha descrito como otra de las proteínas que se une a receptores con ácido siálico de neutrófilos activando su respuesta oxidativa<sup>105</sup>.

### d) **OipA:**

Outer membrane inflammatory protein A, es una adhesina codificada por el gen *oipA*, que al igual que los genes *sabA* y *babA*, pertenece al grupo de factores de virulencia de fase variable, es decir, que están presentes en todas las cepas pero pueden expresarse o no en distintas fases del crecimiento o distintas condiciones ambientales. Su expresión se asocia a una mayor producción de IL-8, aunque no se sabe cuál es su contribución real a la inflamación gástrica puesto que suele estar asociada a las cepas *cagA* +<sup>106</sup>.

### e) **HomB**

Es otra proteína de membrana codificada por el descrito recientemente gen *jhp870*<sup>107</sup>.

La presencia de este gen, también denominado *homB*, se relaciona con<sup>108</sup>:

- La respuesta inflamatoria, incrementando la secreción de Interleucina 8 por parte de las células epiteliales gástricas.
- La capacidad de adherencia de la bacteria a la mucosa gástrica.
- El desarrollo de úlcera péptica.

Presenta un 90% de similitud con el gen *jhp0649* (*homA*), diferenciándose principalmente en regiones del dominio central. El gen *homA*, a diferencia de *homB*, se relaciona con casos de gastritis sin desarrollo de úlcera duodenal<sup>109</sup>.

En una misma cepa pueden estar presentes ambos genes o uno sólo de ellos, y cada uno puede presentar una o más copias: la presencia de dos copias de *homB* aumenta el riesgo de desarrollar úlcera, mientras que una única copia de *homA* lo disminuye<sup>108</sup>. A su vez, la detección del gen *homB*, suele ir acompañada de la detección de otros factores de virulencia como *cagA*, *babA1*, etc.

### **2. 4. 2) Otros factores de virulencia:**

Otros elementos importantes son aquellos que mejoran su capacidad colonizadora y aumentan su supervivencia.

#### **2.4.2.1 Enzima ureasa:**

La producción de esta metaloenzima está condicionada por el pH existente alrededor de la bacteria. *H. pylori* se localiza por debajo de la capa mucosa donde el pH es alrededor de 7<sup>110</sup>. Cuando el pH externo es menor de 6,5, la bacteria, para protegerse del medio ácido, abre un canal específico en la membrana citoplasmática que permite la entrada de urea, que se acumula en el citosol en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. El amonio resultante de su hidrólisis aumenta el pH permitiéndole mantener el potencial de membrana<sup>111</sup>. Pero el amonio liberado conlleva una serie de daños en el hospedador que afectan a la microcirculación desencadenando necrotización del tejido y colaborando en el desarrollo de gastritis atrófica crónica humana.

Como ocurre con otros genes de virulencia, la bacteria, para mantener el equilibrio con el hospedador, ha desarrollado un sistema de control en el que un exceso de amonio (que es también perjudicial para el microorganismo) activa un transportador denominado *UreI* y que permite la entrada de urea, pero una vez el pH alcanza la neutralidad se inactiva.

#### **2.4.2.2 Flagelos:**

*H. pylori* posee de 2 a 6 flagelos polares. La gran movilidad que le proporcionan le permite una mejor colonización de la mucosa<sup>112</sup>. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, FlaA y FlaB. La más abundante es FlaA y se encuentra en el exterior del flagelo, mientras que FlaB se localiza en la base.

Además de los flagelos, la morfología en espiral y la producción de proteasas que digieren el moco también facilitan la llegada de la bacteria al epitelio gástrico.

## INTRODUCCIÓN

### **2.4.2.3 Sistemas antioxidantes:**

*H. pylori* es una bacteria microaerofílica vulnerable a la toxicidad de O<sub>2</sub>. Durante el proceso de colonización *H. pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, que generan una cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno. *H. pylori* cuenta con mecanismos para la detoxificación de estos metabolitos reactivos del oxígeno:

- La enzima superóxido dismutasa, que cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno.
- La catalasa o peroxidasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
- Las peroxirredoxinas, que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes.
- La flavo proteína *MdaB*, una NADPH quinona reductasa, que *H. pylori* expresa cuando debe compensar la pérdida de los principales componentes antioxidantes.

La actividad enzimática de la catalasa, superóxido dismutasa y las peroxirredoxinas está incrementada en las cepas *cagA* positivas.

Cuando los sistemas de detoxificación no son suficientes se activan mecanismos alternativos como la producción de la proteína NAP (Neutrophil activating protein), codificada por el gen *napA*, que tiene función de bacterioferritina para captar los iones ferrosos libres intracelulares que pueden dañar el ADN de *H. pylori* y protege a *H. pylori* del estrés oxidativo.

### **2.4.2.4 Lipopolisacárido(LPS):**

El LPS de *H. pylori* es bastante inerte comparado con el de otras bacterias gram-negativas, y puede explicar la capacidad que tiene el microorganismo para evitar

## INTRODUCCIÓN

provocar una respuesta inmunológica eficaz del huésped. No estimula la producción de IL-8 en cultivos celulares epiteliales sino sólo y ligeramente en monocitos. Al inducir una baja respuesta inmunológica, la infección por *H. pylori* puede persistir durante más tiempo que aquéllas causadas por bacterias más agresivas, produciendo una infección crónica. El LPS de *H. pylori* puede afectar a la integridad de la mucosa mediante la modulación de la actividad del pepsinógeno I en el estómago. Además los niveles de pepsinógeno I caen tras la erradicación de *H. pylori*<sup>113</sup>.

### **2.4.2.5 Gen *jhp0562*:**

Este gen codifica una glicosiltransferasa implicada en la síntesis del lipolisacárido. De momento existen pocos estudios sobre el mismo, pero su presencia o ausencia parece ser relevante en pacientes pediátricos<sup>114</sup>.

Presenta un 80% de similitud con el gen *jhp0563*, encargado de codificar una  $\beta$ -1,3-galactosidasa implicada en la síntesis de Lewis de tipo I del LPS. Según la presencia o no de estos dos genes nos encontramos cuatro posibles patrones<sup>115</sup>:

- Una única copia de *jhp0562*: se relaciona con mayor riesgo de úlcera.
- Una única copia de *jhp0563*: se relaciona con gastritis sin desarrollo de úlcera.
- Una copia de cada gen: también aumenta el riesgo de padecer úlcera.
- Dos copias de distintos tamaños del gen *jhp0563*: bajo riesgo de sufrir úlcera.

### **2. 4. 3) Genes de Resistencia a Antibióticos:**

La elevada tasa de mutación y capacidad de adaptación de *H. pylori* permite que una misma cepa cambie genotípica y fenotípicamente a lo largo de su permanencia en el estómago humano. Estos cambios también le permiten defenderse cuando se comienza el tratamiento antibiótico, apareciendo así las resistencias y fracasos terapéuticos. Las mutaciones responsables de las resistencias serán tratadas en el apartado 2.9.

### **2.5 CLÍNICA:**

*H. pylori* coloniza a más del 50% de la población mundial causando en la mayoría de los casos gastritis subclínicas. Sin embargo, puede ser causa o factor de riesgo para el desarrollo de patologías digestivas más graves, sin que de momento se conozca claramente por qué en unos pacientes la enfermedad es asintomática mientras que en otros produce alteraciones digestivas graves<sup>116</sup>.

Tres tipos de factores principales parecen jugar un papel importante en el desarrollo o no de patología:

- Por un lado aquellos que influyen en la naturaleza y virulencia de la bacteria ya descritos anteriormente.
- Por otro los factores propios de cada hospedador y su sistema inmune: a modo de ejemplo, el polimorfismo descrito en genes que codifican citoquinas proinflamatorias se ha relacionado recientemente con un mayor riesgo de carcinoma gástrico<sup>117</sup> y úlcera duodenal en niños<sup>118</sup>.
- Y por último los factores relacionados con el entorno, los hábitos y las formas de vida.

La interrelación de todos ellos condiciona las diversas manifestaciones producidas por *H. pylori* y su distinta prevalencia geográfica.

Además de la relación directa de *H. pylori* con enfermedades que afectan al sistema digestivo también se ha relacionado, en mayor o menor grado, la presencia de este microorganismo con el desarrollo de algunas manifestaciones extradigestivas.

#### **2. 5. 1) Enfermedades Digestivas:**

Entre las más prevalentes encontramos:

- Gastritis: aguda y crónica
- Úlcera péptica
- Cáncer gástrico

## INTRODUCCIÓN

- Linfoma gástrico MALT
- Reflujo gastroesofágico

### **2.5.1.1- Gastritis:**

Tras la colonización se produce en el 100% de los casos una gastritis histológica que puede cursar bien de forma asintomática o bien como un episodio gástrico autolimitado con dolor epigástrico, náuseas y vómitos<sup>117</sup>. Tras esta fase inicial algunos pacientes desarrollan una gastritis crónica superficial (70-80% de los pacientes que padecen gastritis crónicas diagnosticadas están infectados por *H. pylori*<sup>119</sup>) que puede mantenerse como tal o bien ser el primer paso de la evolución hacia la fase de atrofia que comienza generalmente en el antro y se extiende hacia el cuerpo del estómago<sup>38</sup>.

En caso de cronificación, se produce una infiltración inflamatoria mixta de polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas, con presencia de folículos linfoides denominada gastritis crónica activa.

Estudios histológicos de la biopsia gástrica pueden determinar y graduar el nivel de atrofia al mismo tiempo que visualizar la bacteria mediante tinciones especiales como la tinción de Giemsa o hematoxilina-eosina.

Con el tratamiento adecuado, los síntomas mejoran rápidamente pero la gastritis histológica lo hace más lentamente pudiendo ser visible hasta seis meses o un año después.

### **2.5.1.2- Úlcera péptica:**

Existen diferentes causas que pueden dañar y ulcerar la mucosa gástrica como por ejemplo el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Pero *H. pylori* es el causante principal de úlcera péptica, aislándose hasta en el 90%<sup>120</sup> de los casos de úlcera duodenal y hasta un 70% de las gástricas. Además se produce la curación de la misma tras la erradicación del microorganismo mediante tratamiento antibiótico



## INTRODUCCIÓN

adecuado. Es por ello que, el descubrimiento de *H. pylori* como principal agente causante, supuso una revolución en el tratamiento y pronóstico de esta patología.

Cepas especialmente virulentas, una determinada predisposición del hospedador y la influencia de sus hábitos y entorno, determinarán la progresión o no desde la gastritis inicial a la úlcera péptica. Sin embargo, en caso de producirse, es posible encontrar dos situaciones distintas en función de la localización de la gastritis inicial:

### **a) Gastritis con predominio antral:**

La colonización por *H. pylori*, produce una disminución en la liberación de somatostatina por parte de las células D localizadas en el estómago. La somatostatina es una hormona que, entre otros mecanismos, actúa sobre las células G inhibiendo la liberación de gastrina. Al disminuir los niveles de somatostatina, los de gastrina se ven incrementados. Los altos niveles de gastrina actúan estimulando la producción ácida de las células parietales del antro. Esta secreción ácida es vertida al duodeno cuyo epitelio evoluciona hacia un estado de metaplasia que permite la colonización por parte de *H. pylori*. Tras la colonización se produce la inflamación y la **úlcera duodenal**<sup>121,122</sup>.

### **b) Gastritis con predominio en el corpus o pangastritis:**

En estos casos, el aumento en los niveles de gastrina no es capaz de aumentar la secreción ácida por parte de las células parietales, pero la continua acción de esta hormona sobre el epitelio gástrico provoca una atrofia del mismo que aumenta el riesgo de **úlcera gástrica** al mismo tiempo que protege frente a la duodenal debido a los bajos niveles de secreción ácida. Esta situación es más frecuente en pacientes de edad avanzada, mientras que la úlcera duodenal predomina en adultos de mediana edad<sup>5</sup>.

### **2.5.1.3- Carcinoma gástrico:**

El cáncer gástrico supone la segunda causa mundial de muerte por cáncer con alrededor de 876 000 nuevos casos y 405 000 muertes estimadas en el año 2000<sup>123</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La prevalencia de *H. pylori* en cáncer gástrico es difícil de conocer ya que la bacteria puede desaparecer durante la malignización del tejido. Lo que sí ha sido demostrado en estudios epidemiológicos recientes y en ensayos con modelos animales, es que la gastritis crónica es un importante factor de riesgo para su desarrollo y que *H. pylori* es una de las principales causas para padecerla<sup>124,125,126,127</sup>. Por este motivo la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera desde 1994 como un agente carcinógeno tipo 1 asociado con cáncer gástrico<sup>18</sup>. Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos por los que *H. pylori* estimula la progresión de las lesiones hasta desembocar en cáncer son complejas de definir<sup>68</sup>: la liberación de radicales libres que dañan las células gástricas<sup>128</sup>, la hipergastrinemia que acompaña al estado de atrofia y estimula la proliferación celular aumentando el riesgo de mutaciones<sup>129</sup> o la acción de determinados genes de virulencia (*cagA*, *vacA* s1m1, etc)<sup>130</sup> son algunas de las teorías que explican parcialmente dicha evolución.

Histopatológicamente el carcinoma gástrico se subdivide en el tipo intestinal y el difuso. El carcinoma gástrico tipo intestinal se da principalmente en gente de avanzada edad y es más común que el tipo difuso que afecta a gente joven y tiene un peor pronóstico.

Un pequeño porcentaje de los casos de cáncer gástrico de tipo difuso tiene un origen hereditario, en este caso mutaciones en el gen *Ecadherina* son la causa directa y no una infección previa<sup>131</sup>.

El cáncer gástrico es la fase final de la progresión desde la gastritis inicial al carcinoma pasando por la atrofia, metaplasia y displasia. El punto crucial en esta progresión es la atrofia gástrica, ya que la erradicación de *H. pylori* en estómagos humanos cuya mucosa se encuentra ya en fase de atrofia no parece reducir de forma importante el número de casos que finalmente desarrollan carcinoma (lo que implica que

## INTRODUCCIÓN

probablemente los efectos del microorganismo sobre el epitelio, se den de una forma relativamente temprana en el proceso carcinogénico). Por el contrario, la erradicación del microorganismo en una fase previa a la atrofia, si parece prevenir esta patología<sup>132</sup>. Este hecho hace pensar que *H. pylori* no produce cáncer gástrico *per se*, sino un estado de atrofia que podrá desembocar en él. Por este motivo, los esfuerzos terapéuticos deben centrarse en prevenir el paso de la gastritis a la atrofia gástrica<sup>5</sup>.

### **2.5.1.4- Linfoma gástrico MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue):**

Los linfomas gástricos primarios constituyen en torno al 3-6% de las patologías malignas gástricas<sup>133</sup>. La mayoría de ellos son linfomas no Hodgkin de células B de alto grado, pero en 1983 Isaacson y Wright<sup>134</sup> describieron unos linfomas gástricos de células B de bajo grado que poseían ciertas características clinicopatológicas diferentes al resto de linfomas de células B de bajo grado localizados en otras regiones del cuerpo humano. Propusieron entonces la denominación de linfomas gástricos tipo MALT.

Se localiza preferentemente en la zona del antro gástrico. En este caso la relación entre la patología y *H. pylori* también se demuestra por la detección del microorganismo en el 90 %<sup>135</sup> de los pacientes que padecen linfoma gástrico tipo MALT, la detección de alteraciones morfológicas compatibles con dicha patología en la mayoría de los pacientes infectados por *H. pylori*<sup>133</sup> y la regresión del linfoma de bajo grado tras la erradicación del microorganismo<sup>136</sup>.

### **2.5.1.5- Reflujo gastroesofágico:**

A diferencia de las patologías citadas anteriormente, lo que se ha relacionado con la aparición de este reflujo no ha sido la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica sino la erradicación de la misma.<sup>137</sup> El ser humano ha convivido y evolucionado con *H. pylori* a lo largo de su historia, formando parte de la flora frecuente del hombre. Esta convivencia ha dado lugar a cambios inmunológicos y fisiológicos en el hombre y a la

## INTRODUCCIÓN

interacción de uno sobre el otro. Un ejemplo claro de ello es la influencia del microorganismo en la secreción ácida del estómago. Diversos estudios<sup>138</sup> defienden la posibilidad de que, aquellos pacientes a los que se les erradica el microorganismo, puedan ver alterado el equilibrio ácido que mantenían, siendo más susceptibles para desarrollar alteraciones esofágicas (reflujo principalmente) como consecuencia de una acidez elevada y descontrolada. En cualquier caso se recomienda el tratamiento de este microorganismo en los pacientes que lo requieran y el posterior uso de inhibidores de la bomba de protones en el caso de que el reflujo post-tratamiento aparezca.

### **2. 5. 2) Enfermedades Extradigestivas:**

Muchas publicaciones han relacionado la infección por *H. pylori* con una variedad de manifestaciones clínicas extradigestivas (síndrome de muerte súbita del lactante, enfermedad coronaria, colangitis esclerosante primaria...) sin que se haya podido demostrar la causa<sup>139</sup>. Sin embargo si se han demostrado diferentes grados de evidencia que sustentan la relación de la infección por *H. pylori* como:

#### **2.5.2.1- Anemia ferropénica refractaria:**

La anemia ferropénica refractaria ha sido relacionada con la infección por *H. pylori* especialmente en pacientes pediátricos por poseer unos depósitos de hierro más bajos<sup>140</sup>. No está claro si podría deberse a un incremento en las pérdidas de hierro o a una disminución de la absorción, pero parece demostrado que la erradicación del microorganismo conlleva la normalización de los niveles de hierro y de los valores de ferritina en determinados pacientes<sup>141</sup>.

Los mecanismos a través de los cuales *H. pylori* puede conducir a esta situación no han sido, por el momento, bien definidos: algunos autores apuntan la posibilidad de que la anemia pudiera estar provocada por pérdidas microscópicas de sangre debidas a la gastritis crónica superficial activa. También es cierto que una gastritis atrófica conlleva

## INTRODUCCIÓN

una disminución de la acidez y que esto a su vez dificulta la absorción de hierro y una pérdida de la producción de factor intrínseco, proteína que se une a la vitamina B12<sup>142</sup>.

Otra posible explicación podría ser el incremento del secuestro del hierro por la lactoferrina (proteína ligadora de hierro) cuyos niveles en la mucosa gástrica de los pacientes infectados por *H. pylori* están elevados<sup>143</sup>. O bien que la ferropenia se deba a la propia competencia por el hierro entre la bacteria y el huésped infectado.

### **2.5.2.2- Púrpura Trombocitopénica idiopática:**

Algunos pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática crónica han respondido a la erradicación de *H. pylori* con un incremento del número de plaquetas<sup>144</sup>. La explicación biológica de esta posible asociación es la similitud de los anticuerpos plaquetarios del suero con la citosina asociada al gen *cagA* del *H. pylori*.

### **2.5.2.3- Retraso en el crecimiento:**

Los primeros trabajos publicados, encontraron una relación significativa entre la infección y el retraso de la talla de niños y adolescentes, postulándose que la infección podría afectar al crecimiento. Estudios posteriores no han encontrado ninguna evidencia del papel de *H. pylori* en relación con la talla, y sí más con el estatus socioeconómico de los pacientes: un mayor riesgo de episodios diarreicos e hiponutrición, sería la causa más probable del retraso estructural<sup>145</sup>. Otra posible explicación sería la afectación de los niveles de grelina y leptina. Recientemente se ha demostrado que el estómago es fuente de estas hormonas. La colonización por *H. pylori* y la gastritis produciría un aumento de los niveles de leptina y una disminución de los de grelina, lo que repercutiría en el apetito, disminuyendo el aporte calórico y afectando secundariamente a su índice de masa corporal<sup>146,147</sup>.

### **2.5.2.4- Otras manifestaciones extradigestivas:**

Diversas afectaciones alérgicas se han asociado con la infección por *H. pylori* como por ejemplo los títulos elevados de anticuerpos específicos tipo IgG frente a *H. pylori* en algunos casos de pacientes con urticaria crónica<sup>148</sup>, pero también en otras situaciones como el asma o la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>149</sup>.

## **2.6 RESPUESTA INMUNE FRENTE *H. pylori*:**

La colonización por *H. pylori*, independientemente de la virulencia de la cepa y de la patología a la que vaya a dar lugar, siempre desencadena una importante respuesta inmune. Sin embargo, esta respuesta es incapaz de erradicar el microorganismo y se mantiene activada a lo largo del tiempo contribuyendo, probablemente, al desarrollo de síndromes de larga duración<sup>150</sup>.

Tras la colonización, comienza una fase de infiltración masiva de polimorfonucleares y células monocíticas acompañada por un marcado aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias como son la Interleucina (IL) 6, IL-8, IL-12, IL-11 $\beta$ , el factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferón  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ) entre otras<sup>151</sup>. La cantidad de estas células infiltradas y de las interleucinas liberadas sí parece tener relación con la virulencia de la cepa (CagA se ha relacionado con mayores niveles de IL-12) y la patología desarrollada (úlcera duodenal se acompaña de elevados niveles de IL-12 e IL-10<sup>152</sup>).

Tras la infiltración se ponen en marcha mecanismos tanto de inmunidad innata como adquirida. La respuesta innata se ve desencadenada principalmente por factores de virulencia como la Isla de Patogenicidad CagA, cuya presencia se asocia con la producción de **IL- 8** por parte de las células epiteliales gástricas<sup>153</sup>. La respuesta inmune adquirida, en cualquier tipo de infección, incluye mecanismos antigénicos o humorales y mecanismos celulares. En el caso de la infección por *H. pylori*, diversos estudios muestran la importancia de la respuesta mediada por linfocitos T helper (linfocitosTh)<sup>154</sup>. Estos linfocitos, a su vez, pueden subdividirse en dos tipos claramente diferenciables<sup>155</sup>:

- Linfocitos Th1: Que median la respuesta inmune celular por lo que producen elevados niveles de INF $\gamma$  pero no de IL- 4 ni 5.

## INTRODUCCIÓN

- Linfocitos Th2: Que inducen respuesta humoral por lo que producen elevados niveles de IL- 4 y 5 pero no de INF $\gamma$ .

La diferenciación de los linfocitos Th naïve hacia uno de estos dos subtipos, viene determinada por la presencia de otras interleucinas como son la **IL-10**, la **IL-12** o el **INF $\gamma$** <sup>156</sup>. Las dos últimas, inducen la diferenciación hacia Th1, mientras que la IL-10 inhibe a la IL-12 impidiendo por tanto de forma indirecta, la diferenciación hacia Th1 y favoreciendo la Th2<sup>157</sup>.

En la infección por *H. pylori*, la secreción de **IL-12** es la predominante, lo que confirma que la respuesta inmune en esta infección está esencialmente dirigida por **linfocitos Th1** (respuesta celular), que son además los más abundantes tras la colonización por dicho microorganismo.

La **IL-12** es una citoquina heterodimérica, formada por dos cadenas, p40 (específica de esta interleucina) y p35, codificadas a su vez por 2 genes localizados en cromosomas distintos<sup>158</sup>. La unión de ambas cadenas da lugar a un heterodímero (p70) biológicamente activo. La producción de esta interleucina se produce desde células mononucleadas (células fagocíticas, dendríticas, etc) sin que el mecanismo por el cual *H. pylori* desencadena su liberación haya sido, de momento, completamente esclarecido<sup>152,159</sup>. La producción de IL-12 parece esencial para la protección frente a *H.pylori*, sin embargo, elevados niveles de la misma a lo largo del tiempo se han relacionado con distintas patologías como la úlcera péptica<sup>159</sup>. Asimismo, se ha sugerido recientemente que el polimorfismo del hospedador en la producción de esta interleucina sea un factor importante para el desarrollo de patologías más o menos severas<sup>158</sup>.



### **2.7 DIAGNÓSTICO:**

El método diagnóstico ideal sería aquel que permitiera detectar la presencia del microorganismo vivo y su sensibilidad antibiótica de una forma no invasiva, barata y disponible en todos los centros. Ninguno de los métodos existentes en la actualidad cumple todas estas características. Por ello, a la hora de elegir el más adecuado para cada caso habrá que tener en cuenta en primer lugar el objetivo (epidemiológico, diagnóstico o de seguimiento), el centro sanitario dónde se realice el diagnóstico y las características del paciente<sup>160,161</sup>. En la actualidad disponemos de distintas pruebas que se agrupan en dos grandes grupos: las que implican métodos invasivos para su realización y las que no.

#### **2. 7. 1) Métodos invasivos:**

Son aquellos para los que es necesaria la obtención de una **biopsia** de la zona del antro (por ser la que mayor cantidad de microorganismo alberga) tomada generalmente mediante endoscopia. La obtención de la biopsia permite:

- Realizar un cultivo directo de la muestra
- Analizar histológicamente el tejido
- Observar al microscopio directamente la biopsia
- Realizar la prueba rápida de la ureasa
- Llevar a cabo métodos moleculares

##### **2.7.1.1- Cultivo:**

La muestra más habitual para el cultivo es una biopsia de mucosa gástrica. Es considerado el método de referencia<sup>162</sup> y la principal ventaja es que permite realizar posteriores pruebas de sensibilidad a antibióticos y tipificación de las cepas.

## INTRODUCCIÓN

Como desventajas destacan que la bacteria es de lento crecimiento, lo que demora varios días el diagnóstico, y que la sensibilidad de la técnica depende de la experiencia en su cultivo y de que la toma y el transporte se realicen en las condiciones adecuadas:

Durante el transporte la biopsia debe protegerse de la deshidratación, del aire y mantenerse a baja temperatura (4° C si se van a procesar dentro de las primeras 4 horas o -70° C en caso de que se demore más tiempo). Los medios de transporte más utilizados son: solución de glucosa al 20 % y el suero fisiológico. Otra posibilidad es sembrar directamente la biopsia o utilizar el sistema de transporte Portagerm *pylori*.

La identificación se realiza mediante observación macroscópica de las colonias, tinción de Gram para visualizar la bacteria y confirmación de que las pruebas de la catalasa, la ureasa y la oxidasa son positivas.

### **2.7.1.2- Análisis histológico:**

El análisis histológico de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Para su realización se han utilizado diferentes tinciones cuya realización suele ser fácil, rápida, de bajo coste y de alta utilidad:

- Warren y Marshall utilizaron la tinción de plata que resalta la apariencia del microorganismo, pero es una técnica costosa y laboriosa que además tiene falsos positivos.
- Potter et al<sup>163</sup> usaron la tinción de Giemsa que detecta hasta un 94% de los cultivos positivos pero dificulta la detección de gastritis.
- La tinción clásica es la tinción de hematoxilina-eosina que permite detectar la presencia de gastritis y en ocasiones también del propio microorganismo.

Ninguna de estas tinciones es específica, si lo son las tinciones con anticuerpos mono o policlonales marcados.

## INTRODUCCIÓN

Las principales limitaciones son, por un lado, que permiten la visión del microorganismo con una sensibilidad y especificidad menor que la del cultivo, y por otro, que son necesarios estudios microbiológicos complementarios para obtener información sobre sensibilidad y virulencia de la cepa.

### **2.7.1.3- Prueba rápida de la ureasa:**

Todas las cepas de *H. pylori* producen grandes cantidades de ureasa, por lo que un resultado positivo es compatible con la presencia del mismo. Puede realizarse directamente sobre la muestra de biopsia. Basta con introducir la biopsia en caldo de urea para determinar, de forma rápida, la capacidad de hidrólisis de urea de los posibles microorganismos presentes en la biopsia. Existen distintos reactivos comerciales que contienen urea a diferentes concentraciones y algún indicador de pH. Así, al producirse la descomposición de la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, el cambio de pH detectado por el indicador da lugar a un cambio de color en el medio.

Los resultados de sensibilidad y especificidad son, en general, superiores al 80% y 90%<sup>164</sup>. La seguridad diagnóstica de la prueba dependerá de la localización de la biopsia utilizada, de la carga bacteriana y del tratamiento previo con antibióticos o con inhibidores de la bomba de protones.

### **2.7.1.4- Métodos moleculares:**

Tras la extracción del ADN directamente de la biopsia, es posible la aplicación de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional o a tiempo real para la detección del microorganismo y el estudio de determinadas regiones de su genoma implicadas en la sensibilidad y patogenicidad<sup>165,166</sup>.

Una de las mayores ventajas es que no requiere condiciones de transporte tan estrictas como el cultivo, aún cuando algunos estudios la encuentran igual de sensible. En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia

## INTRODUCCIÓN

del ADN de *H. pylori* directamente de la biopsia gástrica pero también de otras muestras como heces, saliva o agua<sup>167</sup>, con sensibilidades mucho más bajas.

Los objetivos principales de estas técnicas son :

### **a) Detectar genes específicos de la bacteria:**

Por ejemplo el estudio del gen de la ureasa, el gen del glutamato racemasa (*glmA*) o el gen 16S RNAr, entre otros<sup>168</sup>.

### **b) Detectar factores de virulencia:**

Permite detectar la presencia de diferentes factores de virulencia ya definidos y caracterizarlos.

### **c) Detectar mecanismos de resistencia:**

Se ha utilizado con éxito para detectar la resistencia frente a antibióticos cuyo mecanismo se basa en modificaciones puntuales y bien definidas. Es el caso de claritromicina, para la que las mutaciones que confieren resistencia se encuentran en puntos concretos del gen 23S ARNr. También se ha aplicado la PCR en tiempo real para detectar la resistencia a tetraciclina debida a mutaciones en el 16S ADNr en biopsias gástricas<sup>169,170,171</sup>. Y recientemente también para fluorquinolonas, cuya resistencia se debe, en un porcentaje importante, a mutaciones en la ADN girasa.

### **d) Tipaje del aislamiento:**

Para comparar aislamientos de *H. pylori* cultivados del mismo paciente o de familiares<sup>172</sup>.

## **2. 7. 2) Métodos no invasivos:**

Son aquellos para los que no es necesaria la obtención de una biopsia. Presentan la gran ventaja de ser menos cruentos pero, entre otros, el inconveniente de no permitir estudiar la sensibilidad frente a todos los antibióticos utilizados en la clínica. Por ello, resultan

## INTRODUCCIÓN

esencialmente útiles para la evaluación del seguimiento del tratamiento o estudios epidemiológicos. Existen cuatro posibilidades<sup>161</sup>:

- Prueba del aliento
- Serología
- Antígeno en heces
- Métodos moleculares

### **2.7.2.1- Prueba del aliento:**

Es el método indirecto para detectar la ureasa de *H. pylori*. Consiste en la ingestión de urea marcada con  $C^{13}$  o  $C^{14}$ . Una vez en el estómago y en presencia de *H. pylori* esta urea será hidrolizada por la ureasa del microorganismo liberándose  $^{13}CO_2$  o  $^{14}CO_2$  marcado que desde el estómago difunde a sangre, es transportado por ella a los pulmones y de este modo es liberado con el aliento.

Se considera uno de los métodos no invasivos más seguros para detectar *H. pylori*. La prueba del aliento indica una infección actual por la bacteria, ya que en una infección pasada el resultado sería negativo. Por esto es útil como seguimiento del tratamiento realizado 4 a 6 semanas después de finalizado<sup>160</sup>.

### **2.7.2.2- Serología:**

Busca detectar anticuerpos frente a *H. pylori* principalmente en suero, aunque también es posible en saliva u orina<sup>173</sup>.

Además de ser un método no invasivo, tiene la ventaja de que el tratamiento antibiótico previo del paciente no afecta a su resultado. Los mayores inconvenientes son que no diferencia infección pasada de activa y que además existe una elevada seroprevalencia en pacientes sanos que no llegarán a desarrollar patología. Se utiliza por tanto principalmente en estudios epidemiológicos<sup>198</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Tras la colonización, el sistema inmune responde con un aumento transitorio de IgM, seguido de un aumento de anticuerpos de los tipos IgG e IgA que persisten durante la infección. Puesto que los anticuerpos IgM se detectan sólo transitoriamente, tienen poco valor para el diagnóstico. La principal respuesta sistémica es de tipo IgG por lo que la detección de estos anticuerpos es la más utilizada para el diagnóstico. La detección de anticuerpos específicos contra algunas proteínas del microorganismo, como CagA y VacA puede tener especial interés en estudios sobre virulencia. Puesto que la detección de anticuerpos depende del antígeno utilizado, considerando la heterogeneidad genética de *H. pylori*, algunos autores recomiendan el uso de mezclas de antígenos procedentes de varias cepas para mejorar la sensibilidad de estas técnicas así como su valoración en cada medio. La técnica más utilizada es EIA cuantitativo, mientras los métodos basados en la técnica del Western Blot se utilizan para el estudio de la respuesta frente a antígenos concretos, como CagA y VacA<sup>173</sup>. Se ha observado que más del 95 % de los pacientes infectados con cepas *cagA* positivas desarrollan respuesta inmunológica detectable frente a la proteína CagA (que es altamente inmunogénica), pero es un método que actualmente presenta resultados con muchas discrepancias debido a la posibilidad de infecciones mixtas, falsos positivos, variabilidad de la proteína CagA o que la respuesta inmunológica no se produzca de forma detectable por estar obstaculizada por factores del hospedador.

Existen estudios de detección de anticuerpos frente a *H. pylori* en muestras diferentes al suero (sangre completa, orina, saliva) pero sus resultados muestran bajos niveles de sensibilidad y especificidad por lo que su implantación como métodos validados no se ha producido hasta el momento.

### **2.7.2.3- Detección de Antígeno en heces:**

Existen distintos sistemas comerciales basados en este principio. Es un método no invasivo, cualitativo, cuya muestra es de fácil obtención y conservación, que se puede realizar en cualquier laboratorio y que no requiere la colaboración del paciente. Por ello resulta especialmente útil en niños<sup>174,175,176,177</sup>.

Estos sistemas detectan la presencia de *H. pylori* mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales (mejores resultados con estos últimos) y ha sido principalmente estudiada para establecer el diagnóstico inicial, realizar el seguimiento post-tratamiento en las cuatro a seis semanas posteriores a su finalización y para detectar una posible reinfección.

### **2.7.2.4- Métodos moleculares:**

Como se ha comentado anteriormente, los métodos moleculares consisten en la realización de PCR convencionales o a tiempo real para la detección del microorganismo y el estudio de determinadas regiones de su genoma implicadas en la sensibilidad antibiótica y en la patogenicidad. Se pueden utilizar distintas muestras como heces, saliva o incluso agua contaminada como posible fuente de infección<sup>167</sup>. El inconveniente con estos tipos de muestra es la menor recuperación de ADN para realizar las técnicas moleculares.

### **2.8 TRATAMIENTO:**

El primer interrogante al hablar de tratamiento es:

“¿A qué pacientes se debe tratar?”

Teniendo en cuenta que una proporción importante de la población está colonizada por *H. pylori* pero que sólo un pequeño porcentaje va a desarrollar manifestaciones clínicas, resulta obvio que no será necesario tratar a todos aquellos pacientes *H. pylori* positivos.

Al mismo tiempo ha quedado demostrado que un porcentaje importante de las úlceras pépticas, carcinomas y linfomas gástricos MALT está relacionado con este microorganismo. Por todo ello y atendiendo a los criterios elaborados en el Consenso de Maastrich 2000- 2005<sup>178</sup>, se considera:

- Indicación clara de tratamiento en pacientes con:

- + Úlcera péptica
- + Linfoma gástrico MALT
- + Gastritis atrófica
- + Resección por cáncer gástrico

- Indicación fuerte para diagnosticar y tratar:

- + Familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico
- + Deseo del paciente

En caso de decidirse que el tratamiento es necesario, habrá que hacer una adecuada elección de la terapia. Ésta siempre constará de 2 antibióticos y un compuesto antiulceroso (que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico) que se mantendrán entre 7 y 10 días<sup>179</sup>. Algunos autores han probado pautas cortas, de 3 a 5 días que incluyen 3 antibióticos y otros recomiendan pautas largas, de más de 10 días.



## INTRODUCCIÓN

*H. pylori* es sensible a un gran número de antibióticos *in vitro* pero no todos presentan eficacia *in vivo*. Los antimicrobianos que muestran eficacia clínica y que se utilizan o se pueden utilizar en los tratamientos para erradicar la infección son los siguientes:

1ª Elección	2ª Elección
Amoxicilina	Furazolidona
Tetraciclina	Fluorquinolona
Metronidazol	Rifabutina
Claritromicina	

Como compuestos antiulceroso resultan útiles:

Antiulcerosos
Sales de Bismuto
Antagonistas de los receptores H <sub>2</sub>
RBC (ranitidina citrato de bismuto)
Inhibidores de la bomba de protones:
Omeprazol
Lansoprazol
Pantoprazol

La elección tradicional es la denominada “terapia OCA”: “Omeprazol, claritromicina y amoxicilina” O bien su variante omeprazol, metronidazol y amoxicilina.

La aparición de resistencias ha hecho necesario el uso de otras combinaciones que constituyen las terapias de segunda elección:

- Inhibidor de la bomba de protones, claritromicina y metronidazol
- Terapia cuádruple: dos antiulcerosos y dos antibióticos
- Inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina y rifabutina o levofloxacino

## INTRODUCCIÓN

Para evitar llegar a la utilización de estas terapias de segunda elección, antes de iniciar una pauta de tratamiento se debe considerar el porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en esa población o área geográfica<sup>180</sup> y si este tratamiento falla, o siempre que haya sido necesaria la realización de una biopsia, se recomienda realizar estudios microbiológicos<sup>179,181</sup>.

### **2. 8. 1) Amoxicilina:**

Antibiótico de primera elección, es el único  $\beta$ -Lactámico eficaz frente a *H. pylori* porque:

- Es el más estable en medio ácido
- Alcanza mayores concentraciones en tejidos

Inhibe la correcta formación de la pared bacteriana al unirse a las proteínas que permiten la formación de enlaces peptídicos en la fase final de la síntesis de la pared: las *Penicillin Binding Proteins* (PBPs).

### **2. 8. 2) Claritromicina:**

Es el macrólido más utilizado por su mayor estabilidad en medio ácido. Inhibe la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S en la región peptidiltransferasa del ARNr 23S, de forma que lo que se liberan son péptidos incompletos. Se encuentra entre los antibióticos de primera elección a pesar del aumento destacado de resistencias frente a él<sup>182</sup>.

### **2. 8. 3) Metronidazol:**

Es un antibiótico nitroimidazólico, que necesita una reducción previa en el interior del microorganismo para que sea activo y se liberen los intermediarios tóxicos que realmente dañan el ADN bacteriano. Esta reducción la llevan a cabo proteínas del metabolismo anaerobio exclusivas de algunos parásitos y bacterias anaerobias o microaerófilas que actúan sobre el grupo nitro unido al anillo imidazólico. A pesar de

## INTRODUCCIÓN

sus elevados niveles de resistencia también se encuentra entre los fármaco de primera elección.

### **2. 8. 4) Tetraciclina:**

Compuesto por una estructura tetracíclica, inhibe la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30S de forma que impide la unión del aminoacil-ARNt al ARN mensajero.

No pueden utilizarse en población pediátrica ya que se deposita en huesos y dientes (principalmente en fases de desarrollo) formando un quelato con el calcio.

### **2. 8. 5) Quinolonas:**

Inhiben la replicación del ADN bacteriano porque interacciona con la topoisomerasa II (responsable del superenrollamiento negativo del ADN) en Gram negativos y de la topoisomerasa IV (responsable de la separación del ADN) en Gram positivos. La función de estas enzimas es mantener una estructura que facilite la replicación y transcripción. Están contraindicadas en niños y embarazadas por su toxicidad a nivel articular.

### **2. 8. 6) Rifabutina:**

Es un antibiótico macrocíclico derivado semisintético de la rifampicina con la que comparte mecanismo de acción: inhibe la transcripción bacteriana por unión a la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa. Ha demostrado elevada eficacia en *H.pylori*<sup>181</sup>.

### **2. 8. 7) Furazolidona:**

Fármaco para el que, al igual que el metronidazol, es necesaria una reducción previa tras la cual se liberan radicales nitroaniónicos que producen daño en el ADN bacteriano.

Útil principalmente en la curación de úlceras y erradicación de *H. pylori* de la mucosa gástrica.

### **2. 8. 8) Antiácidos:**

Habitualmente se utilizan tres tipos distintos de fármacos con actividad antiácida<sup>183</sup>:

#### **2.8.8.1- Compuestos de Bismuto:**

Citrato de bismuto coloidal y salicilato de bismuto.

Aumentan la producción de moco y prostaglandinas por la mucosa gástrica, evitan la unión de *H. pylori* a la superficie de la mucosa gástrica y destruyen la integridad de la pared bacteriana. Pero se desconoce con certeza el mecanismo de acción de estos compuestos.

#### **2.8.8.2- Fármacos antagonistas de los receptores de histamina:**

Cimetidina, famotidina, nizatidina, roxatidina, ebrotidina, ranitidina y ranitidina citrato de bismuto.

Actúan en la membrana basolateral de la célula parietal gástrica como antagonistas competitivos de la histidina sobre los receptores de histamina. Reducen, por tanto, la secreción ácida tanto basal como la estimulada por gastrina, histidina y agonistas muscarínicos. No presentan actividad directa frente a *H. pylori*.

#### **2.8.8.3- Inhibidores de la bomba de protones:**

Omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, esomeprazol y rabeprazol.

Actúan en la célula parietal (membrana subapical). Inhiben de forma reversible la enzima H-K ATPasa, bloqueando toda secreción de ácido<sup>184,185</sup>. Tienen actividad frente a *H. pylori* mediante un mecanismo aún no conocido, siendo las nuevas moléculas las que presentan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más bajas<sup>276</sup>.

### **2.9 RESISTENCIAS:**

Los motivos por los que se puede producir fallo en el tratamiento pueden estar relacionados con:

- El tratamiento en si mismo: dosis, duración, tipo de inhibidor de la bomba de protones.
- El paciente: incumplimiento del tratamiento pautado.
- El microorganismo: mutaciones que hagan aparecer resistencias<sup>186</sup>.

#### **2. 9. 1) Descripción de resistencias:**

##### **2.9.1.1- Amoxicilina:**

El mecanismo de resistencia común frente a este antibiótico es la aparición de enzimas betalactamasas. Sin embargo este mecanismo no ha sido descrito en ninguna cepa de *H. pylori*. El mecanismo de resistencia descrito en *H. pylori* se debe a mutaciones en las PBPs, especialmente en la PBP1 codificada por el gen *pbp-1 A*<sup>187</sup>. Por otro lado se han sugerido la reducción de la permeabilidad o la expulsión activa como mecanismos que pueden contribuir a producir una menor sensibilidad al antibiótico.

El porcentaje de resistencias en Europa es de momento bajo aunque en otras regiones como Irán se han descrito resistencias de hasta el 56%<sup>188</sup>.

##### **2.9.1.2- Claritromicina:**

El mecanismo de resistencia observado en *H. pylori* son mutaciones en la subunidad 50S en la región peptidiltransferasa del ARN ribosómico 23S. Las mutaciones más frecuentemente descritas son las producidas en las posiciones 2142 y 2143, concretamente A2142G y A2143G<sup>189</sup>. También han sido descritas cepas resistentes por mutaciones en otras posiciones como 2717 o 2515.

En los últimos años en España y otros países de Europa como Francia, Portugal, Turquía o Bulgaria, se ha observado un aumento significativo de las tasas de resistencia

## INTRODUCCIÓN

frente a este antibiótico, hecho que no ocurre en países del Norte de Europa<sup>190</sup>. Probablemente se deba al uso frecuente de macrólidos desde su comercialización en España en los años 90 frente a distintas infecciones como por ejemplo las respiratorias.

### **2.9.1.3- Metronidazol:**

El mecanismo de resistencia es menos conocido que en el caso de amoxicilina o claritromicina. Parece que se debe mayoritariamente a mutaciones en el gen *rdxA*. Este gen codifica una nitrorreductasa insensible al oxígeno capaz de reducir este antibiótico. A diferencia de la claritromicina, esta resistencia no se debe a determinados cambios de pares de bases en posiciones concretas, sino que puede producirse como consecuencia de mutaciones sin sentido, cambios de fase, deleciones, inserciones, etc. Lo que dificulta su estudio genotípico. Se han observado también mutaciones en otros genes (*frxA*, *fdxB*, *ribF* o *mdaB*) que codifican otras enzimas reductoras y que también pueden tener importancia.

Se utiliza, además de en el tratamiento de *H. pylori*, en infecciones ginecológicas y como antiparasitario<sup>237</sup>. Este hecho hace que los niveles de resistencia sean muy variables según el mayor o menor uso de este antibiótico como tratamiento de otras patologías, de forma que en países en vías de desarrollo la resistencia sea incluso superior al 50%<sup>191,192</sup>.

### **2.9.1.4- Tetraciclina:**

El principal mecanismo de resistencia de este antibiótico en *H. pylori* consiste en mutaciones del gen 16S rARN en las posiciones 926, 927 y/o 928<sup>193</sup>. Si la mutación se da en una única posición la resistencia observada es de bajo nivel mientras que si se dan las tres simultáneamente la resistencia es de alto nivel. Se ha descrito el cultivo de cepas sin mutaciones pero con menor acumulación de tetraciclinas se comportan como resistentes por lo que la reducción de permeabilidad parece jugar también un papel

## INTRODUCCIÓN

importante en la aparición de resistencias. Sin embargo, el porcentaje de resistencia frente a este antibiótico es muy bajo<sup>160</sup>.

### **2.9.1.5- Quinolonas:**

La diana de acción de las quinolonas en *H. pylori* es, por ser un Gram negativo, la topoisomerasa II o ADN girasa. Esta enzima está compuesta por dos subunidades (A y B). Las resistencias en *H. pylori* se producen por mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*. Concretamente se han descrito 4 mutaciones destacadas en la subunidad A: asparraginas por lisina en la posición 87, alanina por valina en la 88, aspartato por glicina, tirosina o asparraginas en la 91 y alanina por valina en la 97. Las mutaciones en otros puntos parecen tener menor repercusión clínica. La resistencia a esta familia de antibióticos es aún baja pero debe ser vigilada por su aumento en los últimos años<sup>194</sup>.

### **2.9.1.6- Rifabutina:**

La resistencia frente a este antibiótico es de momento baja y se debe a mutaciones en el gen *rpoB*. Este gen codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa y su mutación da lugar a una menor afinidad del antibiótico por ella. Las mutaciones descritas afectan a los aminoácidos 149, 524-545 y 586<sup>277</sup>.

### **2.9.1.7- Furazolidona:**

El mecanismo de resistencia es poco conocido. Se sabe que comparte mecanismo de acción con el metronidazol, pero que el de resistencia debe ser distinto porque no se ha descrito resistencia cruzada.

## **2. 9. 2) Detección de resistencias:**

La detección de resistencias frente a los fármacos disponibles para el tratamiento puede realizarse mediante métodos fenotípicos, observando el crecimiento tras el cultivo, o genotípicos, detectando las mutaciones implicadas en la resistencia<sup>195</sup>. Los métodos fenotípicos tienen como inconvenientes el lento crecimiento de *H. pylori* y la fácil

## INTRODUCCIÓN

contaminación de los cultivos. Los métodos genotípicos son más rápidos (el microorganismo no tiene que crecer), tienen buena correlación con los fenotípicos y son capaces de detectar infecciones mixtas por cepas sensibles y resistentes. Su inconveniente principal son las múltiples posibilidades de mutación dentro de cada antibiótico, lo que dificulta el diseño de técnicas que puedan detectar todas las posibilidades simultáneamente. De momento las mejor estandarizadas son las que detectan resistencia a claritomicina y/o fluorquinolonas.

### **2.9.2.1- Métodos fenotípicos:**

Existen tres posibilidades:

#### **a) Dilución en Agar sangre:**

En 1999 la NCCLS lo define como método de referencia para determinar la sensibilidad en *H. pylori*. Permite conocer la concentración mínima inhibitoria, pero es un método laborioso y poco rentable si se estudian pocas cepas, por lo que se utiliza para confirmar datos obtenidos por otros métodos o para conocer la tasa global de resistencia en un área determinada.

#### **b) Difusión en disco:**

Es un método sencillo, cómodo y barato que se utiliza de forma rutinaria en muchos centros a pesar de que la correlación con la dilución en agar no siempre es exacta, especialmente para metronidazol.

#### **c) Difusión con Epsilon test:**

Al igual que la dilución en agar, permite conocer la CMI pero es de una forma menos laboriosa. Necesita una placa para cada antibiótico y microorganismo, sin embargo, es el método recomendado por la British Society of Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) y por ello es también el que se utiliza actualmente en la mayoría de los análisis.



### **2.9.2.2- Métodos genotípicos:**

Las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten tanto la detección y cuantificación del microorganismo (mediante amplificación de genes altamente conservados) como la detección de mutantes que confieren resistencia a determinados antibióticos. En el caso de *H. pylori* estas técnicas resultan principalmente útiles en el estudio de sensibilidad frente a claritromicina y fluorquinolonas debido a que:

- Para claritromicina un alto porcentaje de las resistencias se deben a mutaciones localizadas en dos únicos puntos: las posiciones 2142 y 2143
- Para fluorquinolonas un porcentaje importante de las resistencias se debe a mutaciones en los nucleótidos que codifican los aminoácidos de las posiciones 87, 88, 91 y 97 de la ADN girasa.

Es decir, que presenta como ventajas frente al cultivo su rapidez, buena correlación y la eliminación del peligro de contaminación, pero como inconveniente que, de momento, no se puede utilizar rutinariamente para estudiar todos los antibióticos con actividad frente a *H. pylori*. Las técnicas de PCR, ya sea tradicional o a tiempo real, se diferencian entre sí por la forma en la que se detectan las posibles mutaciones en el fragmento amplificado: mediante digestión con enzimas MboII y BsaI<sup>196</sup>, por ensayo de hibridación en fase sólida o líquida con oligonucleótidos o mediante la unión de sondas fluorescentes.

### **3. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

1. **Determinar la prevalencia y distribución de distintos factores de virulencia en aislamientos de *Helicobacter pylori* obtenidos a partir de biopsias gástricas de pacientes sintomáticos.**
2. **Analizar la interrelación de estos factores de virulencia, que incluyen factores clásicos y otros de reciente descripción, en los aislamientos de *Helicobacter pylori* estudiados.**
3. **Cuantificar la producción de interleucina 12 tras el cocultivo de los aislamientos de *H. pylori* y células mononucleares de sangre periférica y comprobar si dicha producción guarda relación con los factores de virulencia presentes en los aislamientos estudiados.**
4. **Analizar los patrones de sensibilidad antibiótica de los aislamientos a estudio y la correlación entre métodos fenotípicos y genotípicos para claritromicina y fluorquinolonas.**
5. **Estudiar la relación entre la sensibilidad antibiótica y los distintos patrones de virulencia de los aislamientos de *Helicobacter pylori*.**

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 SELECCIÓN DE BIOPSIAS:**

Se estudiaron 80 aislamientos de *Helicobacter pylori* obtenidos a partir de biopsias gástricas de pacientes sintomáticos: niños (menores de 16 años) y adultos (mayores de 16 años). Las biopsias fueron cultivadas entre enero de 2008 y diciembre de 2009 en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario de La Princesa.

Las muestras procedían del Servicio de Digestivo del propio Hospital Universitario de la Princesa así como de la Unidad de Gastroenterología del Hospital Infantil del Niño Jesús y del Hospital Universitario Doce de Octubre.

Todas ellas fueron seleccionadas por resultar *H. pylori* positivas mediante cultivo, tinción de Gram y pruebas de ureasa, catalasa y oxidasa. Cada una de ellas, fue analizada para determinar su sensibilidad antibiótica (métodos fenotípicos y genotípicos) y la presencia o ausencia de factores de virulencia (estudio molecular). Posteriormente, se realizó un estudio *in vitro* sobre la producción de interleucina 12 (ensayos inmunológicos) con una parte representativa del total de las muestras.

### **4.2 TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS:**

Las biopsias obtenidas de pacientes sintomáticos mediante endoscopia se recogieron en un tubo estéril con 1 mililitro de solución salina para evitar su desecación. Posteriormente fueron enviadas a una temperatura de 4°C al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de La Princesa donde fueron procesadas en menos de 3 horas. En caso de que el envío y recepción de la muestra fueran a superar las 24 horas las muestras se congelaron a -80 °C para mantener su viabilidad.

### **4.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE *H. pylori*:**

La identificación de *H. pylori* en todas las biopsias estudiadas se realizó mediante cultivo, microscopía y pruebas bioquímicas. Para ello cada biopsia se sembró por rotación repetida con ayuda de una torunda sobre la superficie de dos medios de cultivo comerciales:

- Una placa de Agar Sangre (Columbia Agar con 5% de sangre de oveja; BioMérieux).
- Una placa de Agar *Pylori* (*Pylori* Agar; BioMérieux)

Ambos tipos de placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) durante 15 días a lo largo de los cuales fueron revisadas periódicamente para detectar la presencia de colonias pequeñas y translúcidas compatibles con el aspecto y morfología de *H. pylori*.

Una vez extendida la biopsia sobre la superficie del agar, la biopsia restante se congeló a -80°C para estudios posteriores y la torunda utilizada se introdujo en 1 mililitro de caldo ureasa Christensen para determinar la capacidad de hidrólisis de urea de los posibles microorganismos a cultivar.

Las colonias sugestivas por tamaño, forma y aspecto fueron confirmadas como colonias de *H. pylori* por ser positivas para las pruebas bioquímicas de la ureasa, catalasa y oxidasa y al observarse microscópicamente bacilos espiralados Gram negativos.

## **4.4 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CADA**

### **CEPA:**

Para llevarla a cabo se utiliza el sistema automatizado NucliSENS® EasyMAG™ de BioMérieux que permite aislar de forma automática y con alta eficacia el ácido nucleico de diversos microorganismos a partir de distintos tipos de muestras o cepas. Este sistema se basa en la denominada tecnología BOOM® en la que la separación del ADN es posible gracias a la adición de moléculas de sílice a las que se unirá el ácido nucleico una vez lisadas las células (el sistema incluye un primer paso de lisis celular previo a la separación del ADN).

El procedimiento consiste en los siguientes pasos:

1. Se transfieren 400 microlitros de muestra a la cubeta del NucliSENS® EasyMAG™
2. Se prepara la mezcla de sílice-calibrador:  
  
550 microlitros de buffer  
  
+  
  
550 microlitros de sílice
3. Se añade la mezcla de sílice-calibrador a la cubeta donde está la muestra
4. Comienza la extracción automática del ADN: unión del sílice al ADN, eliminación de los restos celulares y separación del sílice y el ADN que queda eluido en un volumen final de 25 microlitros.
5. Se transfiere el eluido a un eppendorf para conservarlo a -20°C o para realizar las técnicas moleculares.

## **4.5 ESTUDIO FENOTÍPICO DE LA SENSIBILIDAD:**

En todas las biopsias seleccionadas se estudió la sensibilidad *in vitro* por difusión en placa frente a los antibióticos más comúnmente utilizados en la terapéutica. Para ello se utilizaron discos de amoxicilina y tetraciclina y E-Test de metronidazol, claritromicina, rifampicina y ciprofloxacino que fueron depositados sobre placas de agar sangre previamente inoculadas con torunda. En el caso de resultados no concluyentes, para amoxicilina y tetraciclina se hizo una segunda determinación con E-test.

Las placas se incubaron en atmósfera microaerofílica leyéndose inicialmente a los tres días y definitivamente a los cinco. En dicha lectura se utilizaron los puntos de corte establecidos por el CLSI<sup>162</sup>, BSAC y los estudios realizados en 2002 por McNulty<sup>197</sup>:

- Amoxicilina: resistente si  $CMI \geq 2\text{mg/L}$  o halo  $\leq 15\text{mm}$  de diámetro
- Tetraciclina: resistente si  $CMI \geq 4\text{mg/L}$  o halo  $\leq 15\text{mm}$  de diámetro
- Metronidazol: resistente si  $CMI \geq 8\text{mg/L}$
- Claritromicina: intermedio si  $CMI = 0,5\text{mg/L}$  y resistente si  $CMI \geq 1\text{mg/L}$
- Ciprofloxacino: intermedio si  $CMI = 2\text{mg/L}$  y resistente si  $CMI \geq 4\text{mg/L}$
- Rifampicina: resistente si  $CMI \geq 32\text{mg/L}$



## **4.6 ESTUDIO GENOTÍPICO DE LA SENSIBILIDAD**

### **A QUINOLONAS Y CLARITROMICINA:**

Se descongelaron 30 biopsias (recibidas entre junio de 2008 y diciembre de 2009) para analizar mediante métodos moleculares su sensibilidad frente a claritromicina y quinolonas y compararla posteriormente con la obtenida fenotípicamente. Para ello se utilizó el kit comercial (**Genotype® Helico DR, Hain**) que consiste en una técnica de amplificación seguida de una de hibridación del producto amplificado con sondas específicas en tiras de nitrocelulosa.

#### **4. 6. 1) Extracción de ADN a partir de biopsias:**

Se comienza con una fase previa de digestión del tejido de la biopsia:

1. Se introduce en un eppendorf al que se añaden:

- ❖ 320 microlitros de agua destilada
- ❖ 40 microlitros de buffer de lisis
- ❖ 40 microlitros de proteinasa K

( total 400 microlitros )

2. Los eppendorf se mantienen a 37° C y en agitación durante toda la noche

Una vez digeridas las biopsias comienza la fase de extracción propiamente dicha, para la que se utiliza el sistema automatizado NucliSENS® easyMAG™ de BioMérieux previamente descrito.

#### 4. 6. 2) PCR convencional del ADN extraído:

Siguiendo las especificaciones del fabricante, a cada 5 microlitros de ADN extraído se le añaden 45 microlitros de una mezcla compuesta por:

	Volumen para cada muestra
Deoxinucleótidos marcados con biotina	35 µl
Taq Polimerasa	0,4
Buffer	5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
Agua	2,5 µl

Tabla 4.6.1

##### 4.6.1.1 Condiciones de la PCR:

Condiciones de la PCR para Detección Resistencias			
Pasos	Temperatura ° C	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	30 segundos	30
Annealing	55	30 segundos	
Extensión	72	30 segundos	
Extensión final	72	7 minutos	1

Temperatura final de mantenimiento 4 °C

Tabla 4.6.2

### **4.6.1.2 Hibridación del ADN amplificado:**

Para este estudio se utilizó el sistema automático Auto-LiPA y el kit comercial **Genotype® Helico DR (Hain)**. De esta forma, se detecta la presencia de *H. pylori* así como su sensibilidad o resistencia frente a claritromicina y quinolonas. Para ello se analizan las posibles mutaciones del gen 23S (posiciones 2142 y 2143) en el caso de claritromicina y del gen *gyrA* (codones 87y 91) para las quinolonas.

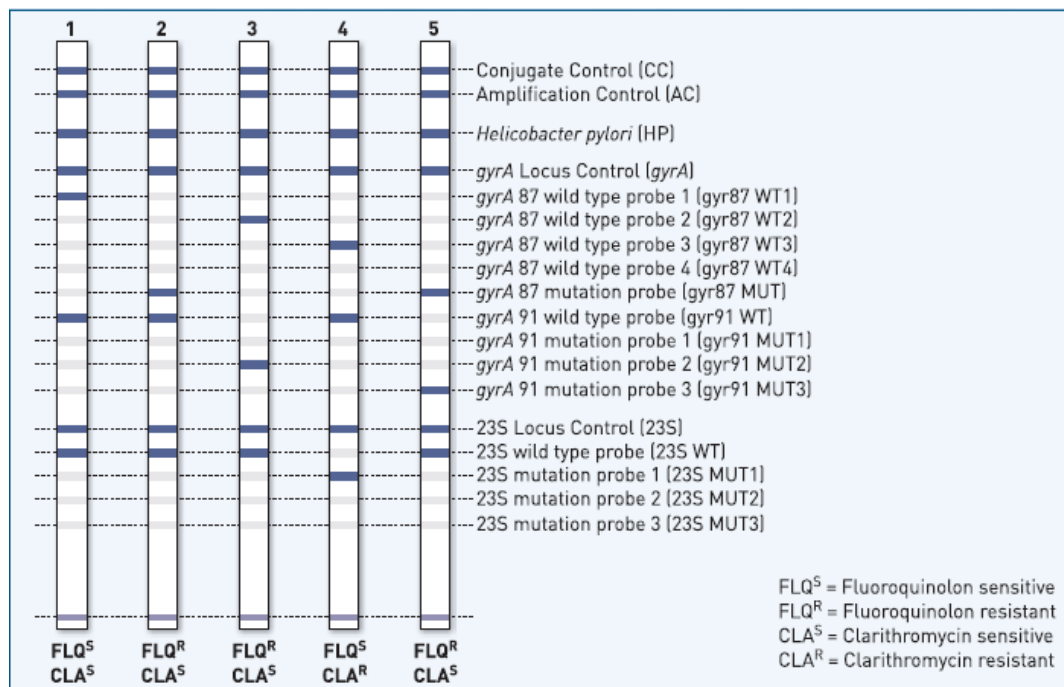
El análisis es posible mediante la hibridación en fase sólida de dichos fragmentos con sondas complementarias al gen nativo y a las posibles mutaciones descritas hasta el momento. El procedimiento consiste en:

- Preparar las soluciones de sustrato y conjugado diluyéndolas en sus respectivos buffers:  
10 µl sustrato o conjugado + 100 µl buffer correspondiente
- Dispensar 20 microlitros de solución de desnaturalización en cada pocillo (uno por cada muestra estudiada)
- Dispensar 20 microlitros de cada muestra amplificada en su pocillo correspondiente y mezclar bien con la solución de desnaturalización añadida previamente.
- Dejar reposar 5 minutos. Mientras, colocar una tira de hibridación en cada pocillo.
- Comienza la fase automática en la que sucesivamente se dan los siguientes pasos:
  - Dispensación de los buffers de hibridación
  - Incubación a 45°C
  - Lavado
  - Dispensación del conjugado

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Incubación a 45°C
  - Lavado
  - Dispensación del sustrato
  - Incubación a 45°C
  - Lavado
- Leer los resultados:

Bandas de color que indicarán la presencia de *H. pylori* y de los genes salvajes o mutados en las posiciones estudiadas.



**Figura 4.6.1: Genotype® Helico DR (Hain)**

## 4.7 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA:

### 4. 7. 1) Detección de gen *cagA*:

#### 4.7.1.1 Primers utilizados<sup>78</sup>:

*cagA* Forward-5' **ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A** 3' Tm 63°C

*cagA* Reverse-5' **TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATC ACG CCA T** 3' Tm 63°C

Que amplifica una secuencia de 297 pares de bases (pb)

#### 4.7.1.2 Mastermix:

Se utilizó el kit comercial **illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare companies)**. Dicho kit contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP,  $\pm 2,5$  unidades de pureTaq polimerasa y buffer de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final de 25  $\mu$ l. Para ello, además de un **1  $\mu$ l del ADN**, son necesarios **24 microlitros de una mezcla** compuesta por:

	Volumen para cada muestra	Concentración final en la Mastermix
<b>Primer <i>cagA</i> Forward</b>	<b>0,375 <math>\mu</math>l</b>	<b>0,3 <math>\mu</math>M</b>
<b>Primer <i>cagA</i> Reverse</b>	<b>0,375 <math>\mu</math>l</b>	<b>0,3 <math>\mu</math>M</b>
<b>Agua</b>	<b>23,25 <math>\mu</math>l</b>	<b>-</b>

**Tabla 4.7.1**

La reacción se llevó a cabo en el termociclador **PCR Express GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)**.

**4.7.1.3 Condiciones de la PCR:**

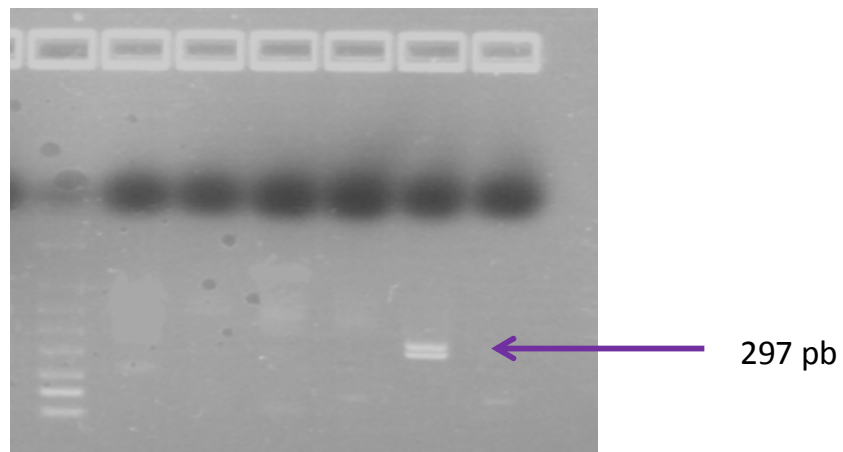
Condiciones de la PCR <i>cagA</i>			
Pasos	Temperatura ° C	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	2 minutos	1
Desnaturalización	94	1 minuto	38
Annealing	60	1 minuto	
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	5 minutos	1

Temperatura final de mantenimiento 4 °C

**Tabla 4.7.2**

**4.7.1.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa:**

Se utilizaron geles de agarosa al 2%.



**Figura 4.7.1**

#### 4. 7. 2) Detección de gen *vacA*:

##### 4.7.2.1 Primers utilizados <sup>30</sup>:

*vacA s* Forward-5' **ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC** 3' Tm 54°C

*vacA s* Reverse-5' **CCT GAG ACC GTT CCT ACA GC** 3' Tm 63°C

*vacA m* Forward-5' **CAATCTGTCCAATCAAGCGAG** 3' Tm 55°C

*vacA m* Reverse-5' **TGAGGTTGTTTGATATTGAC** 3' Tm 64°C

Que amplifica una secuencia de 176/200 pares de bases (pb) para *vacA s1/s2* y 290/350 pb para *vacA m1/m2*.

##### 4.7.2.2 Mastermix:

Se utilizó el kit comercial **illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads** (GE Healthcare companies). Dicho kit contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP,  $\pm 2,5$  unidades de pureTaq polimerasa y buffer de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final debe ser de 25  $\mu$ l. Para ello, además de un **1  $\mu$ l del ADN**, son necesarios **24 microlitros de una mezcla** compuesta por:

	Volumen para cada muestra	Concentración final en la Mastermix
<b>Primer <i>vacA s</i> o <i>m</i> Forward</b>	<b>0,625 <math>\mu</math>l</b>	<b>0,5 <math>\mu</math>M</b>
<b>Primer <i>vacA s</i> o <i>m</i> Reverse</b>	<b>0,625 <math>\mu</math>l</b>	<b>0,5 <math>\mu</math>M</b>
<b>Agua</b>	<b>22,75 <math>\mu</math>l</b>	<b>-</b>

**Tabla 4.7.3**

La reacción se llevó a cabo en el termociclador **PCR Express GeneAmp PCR System 2400** (Perkin Elmer).

**4.7.2.3 Condiciones de la PCR:**

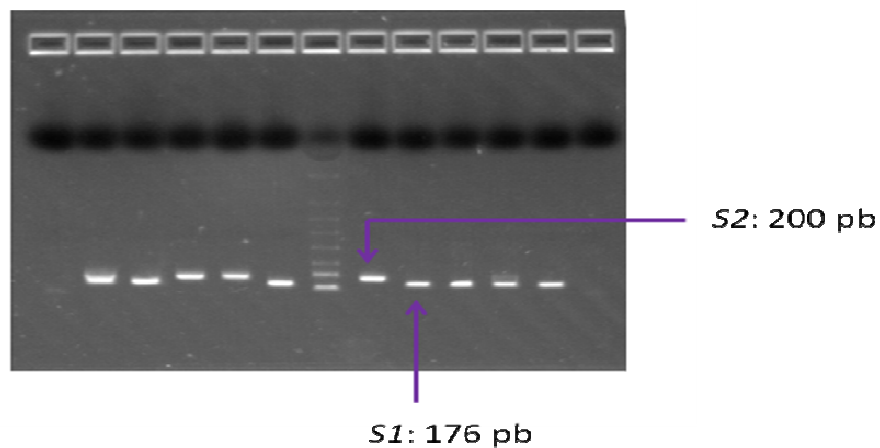
Condiciones de la PCR <i>vacA s y m</i>			
Pasos	Temperatura ° C	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	45 segundos	30
Annealing	52	45 segundos	
Extensión	72	45 segundos	
Extensión final	72	7 minutos	1

Temperatura final de mantenimiento 4 °C

**Tabla 4.7.4**

**4.7.2.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa:**

Se utilizaron geles de agarosa al 2%.



**Figura 4.7.2**



### 4. 7. 3) Detección de gen *dupA*:

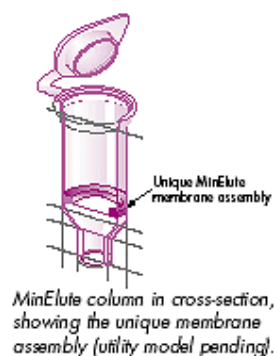
#### 4.7.3.1 Primers utilizados:

Inicialmente se analizaron todos los aislamientos utilizando los primers facilitados por el grupo de investigación del Dr. Atherton (Nottingham Digestive Diseases Centre Biomedical Research Unit, Queen's Medical Centre, University of Nottingham, United Kingdom).

A partir de 10 cepas que resultaron positivas, se diseñaron nuevos primers basados en las características de las cepas españolas.

#### a) **Diseño nuevos primers *dupA*:**

El producto amplificado de las 10 cepas elegidas se purificó utilizando para ello el kit comercial **MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)**. Este kit incluye unos eppendorfs con una membrana de sílice en su interior.



A dicha membrana se une el ADN cuando la concentración de sales es elevada gracias al Buffer PB. El ADN se separa de esta membrana cuando la concentración salina en el medio es baja (Buffer EB o agua). Este proceso de unión-lavado-elución, permite separar el ADN del resto de componentes presentes inicialmente: primers, nucleótidos, enzimas, minerales, aceites, agarosa, bromuro de etidio y otras impurezas. El volumen final de ADN purificado fue de 20 microlitros para cada una de las 10 muestras. Este

## MATERIAL Y MÉTODOS

ADN purificado se secuenció para, posteriormente, alinear y comparar las secuencias obtenidas con una cepa control ya secuenciada (TIGR):

- Los fragmentos *reverse* se transformaron en sus complementarios mediante el uso de

[http://www.geneinfinity.org/sms\\_reversecomplement.htm](http://www.geneinfinity.org/sms_reversecomplement.htm)

- Para la alineación y comparación de las secuencias se utilizó

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

Se eligieron fragmentos de 20 pares de bases que se repitieran en la mayoría de las secuencias comparadas y que tuvieran un elevado número de guanosinas y citosinas en el extremo 3' (para *forward*) o 5' (para el *reverse*). Utilizando la página web Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>), se calcularon las T<sub>m</sub> de los fragmentos seleccionados como *forward* y como *reverse* y se comprobó, asimismo, que las probabilidades de que se formaron dímeros dentro o entre ellos era baja. Los primers diseñados finalmente fueron:

*dupA* Forward-5' **GCT TAT GAT GTG GAT AAT ATC ACT TC** 3' T<sub>m</sub> 56.89°C

*dup* Reverse-5' **CTA ATT GCT ATG TAT TTG TTC CAC A** 3' T<sub>m</sub> 56.81°C

Que amplifican una secuencia de 1076 pb .

### 4.7.3.2 Mastermix:

Se utilizó el kit comercial **illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare companies)**. Dicho kit contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ±2,5 unidades de pureTaq polimerasa y buffer de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final debe ser de 25 µl. Para ello, además de un **1µl del ADN**, son necesarios **24 microlitros de una mezcla** compuesta por:

## MATERIAL Y MÉTODOS

	Volumen para cada muestra	Concentración final en la Mastermix
Primer <i>dupA</i> Forward	0,625 µl	0,5 µM
Primer <i>dupA</i> Reverse	0,625 µl	0,5 µM
Agua	22,75 µl	-

**Tabla 4.7.5**

La reacción se llevó a cabo en el termociclador PCR Express GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

### 4.7.3.3 Condiciones de la PCR:

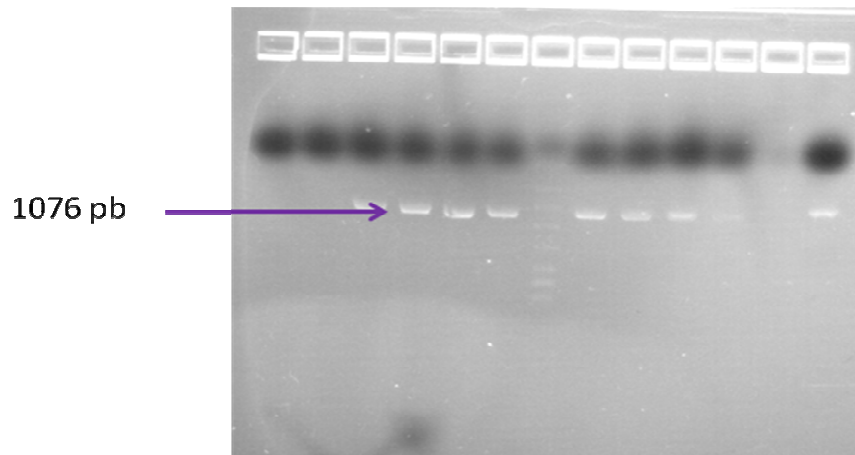
Condiciones de <i>dupA</i>			
Pasos	Temperatura ° C	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	5 minutos	1
Desnaturalización	94	30 segundos	30
Annealing	51	30 segundos	
Extensión	72	1 min 20 seg	
Extensión final	72	5 minutos	1

Temperatura final de mantenimiento 4 °C

**Tabla 4.7.6**

**4.7.3.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa:**

Se utilizaron geles de agarosa al 2%.



**Figura 4.7.3**

#### 4. 7. 4) Detección de genes *homA* y *homB* :

##### 4.7.4.1 Primers utilizados<sup>114</sup>:

*hom* Forward-5' **AGA GGG TGT TTG AAA CGC TCA ATA** 3' Tm 62°C

*hom* Reverse-5' **GGT GAA TTC TTC TGC GGT TTG** 3' Tm 56.81°C

Que amplifica una secuencia de 128 pb para *homA* y 161 pb para *homB*.

##### 4.7.4.2 Mastermix:

Se utilizó el kit comercial **illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads** (GE Healthcare companies). Dicho kit contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ±2,5 unidades de pureTaq polimerasa y buffer de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final debe ser de 25 µl. Para ello, además de un **1µl del ADN**, son necesarios **24 microlitros de una mezcla** compuesta por:

	Volumen para cada muestra	Concentración final en la Mastermix
<b>Primer <i>hom</i> Forward</b>	<b>0,625 µl</b>	<b>0,5 µM</b>
<b>Primer <i>hom</i> Reverse</b>	<b>0,625 µl</b>	<b>0,5 µM</b>
<b>Agua</b>	<b>22,75 µl</b>	<b>-</b>

**Tabla 4.7.7**

La reacción se llevó a cabo en el termociclador **PCR Express GeneAmp PCR System 2400** (Perkin Elmer).

**4.7.4.3 Condiciones de la PCR:**

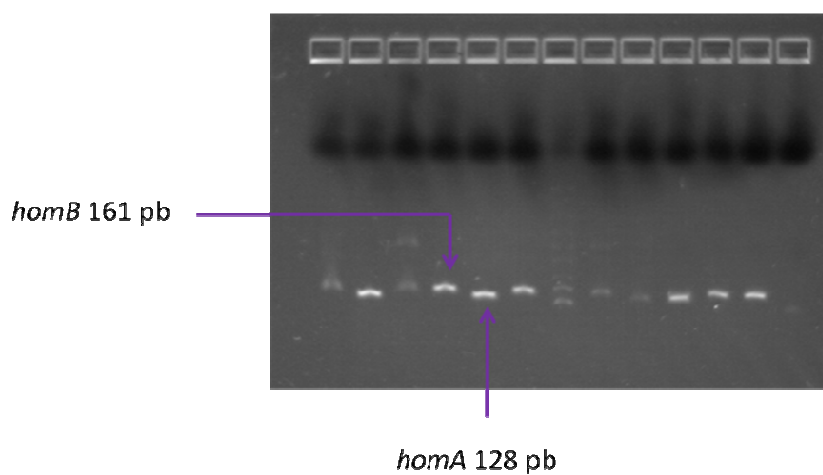
Condiciones de <i>hom</i>			
Pasos	Temperatura ° C	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	1 minuto	30
Annealing	59	1 minuto	
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	5 minutos	1

Temperatura final de mantenimiento 4 °C

**Tabla 4.7.8**

**4.7.4.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa:**

Se utilizaron geles de agarosa al 2%.



**Figura 4.7.4**

#### 4. 7. 5) Detección de genes *jhp0562* y *jhp0563*:

##### 4.7.5.1 Primers utilizados<sup>114</sup>:

*jhp0562* Forward-5' **TGA AAA GCC CTT TTG ATT TTG** 3' Tm 54°C

*jhp0562* Reverse-5' **GCT GTA GTG GCC ACA TAC ACG** 3' Tm 63°C

Que amplifica dos posibles secuencias: una de 301 pb que corresponde a *jhp0562*, y otra de 602 pb que corresponde al gen *jhp0563*.

##### 4.7.5.2 Mastermix:

Se utilizó el kit comercial **illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare companies)**. Dicho kit contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP,  $\pm 2,5$  unidades de pureTaq polimerasa y buffer de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final debe ser de 25  $\mu$ l. Para ello, además de un **1  $\mu$ l del ADN**, son necesarios **24 microlitros de una mezcla** compuesta por:

	Volumen para cada muestra	Concentración final en la Mastermix
Primer <i>jhp0562</i> Forward	0,375 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
Primer <i>jhp0562</i> Reverse	0,375 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
Agua	23,25 $\mu$ l	-

**Tabla 4.7.9**

La reacción se llevó a cabo en el termociclador **PCR Express GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)**.

**4.7.5.3 Condiciones de la PCR:**

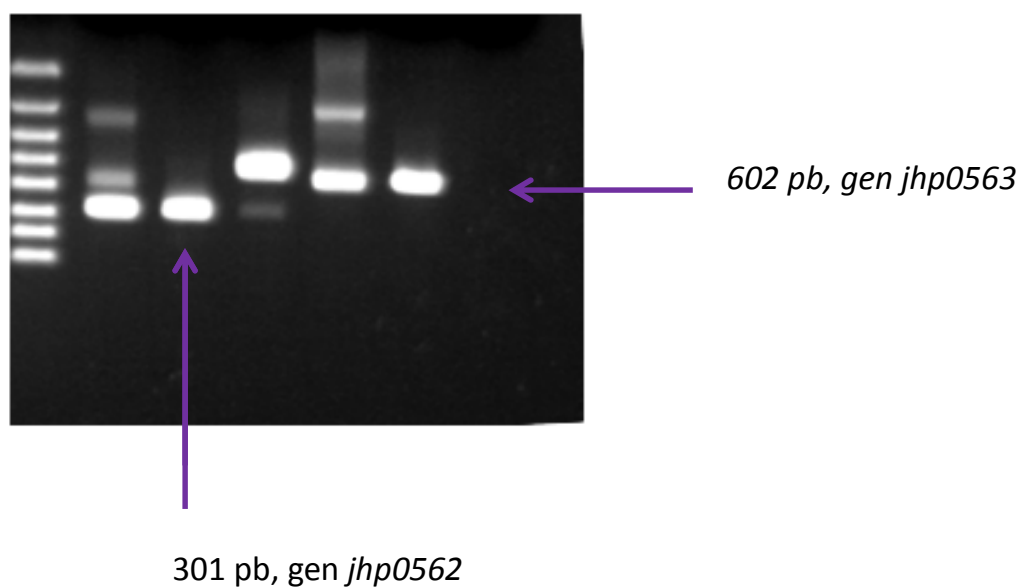
Condiciones de <i>jhp0562</i>			
Pasos	Temperatura ° C	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	1 minuto	30
Annealing	63	1 minuto	
Extensión	72	45 segundos	
Extensión final	72	5 minutos	1

Temperatura final de mantenimiento 4 °C

**Tabla 4.7.10**

**4.7.5.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa:**

Se utilizaron geles de agarosa al 2%.



**Figura 4.7.5**



## **4.8 CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUCINA 12 LIBERADA POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA:**

### **4. 8. 1) Preparación de medios de cultivo celular:**

- **Medio de lavado:** 500 ml RPMI 1640 medium (Invitrogen)  
10 ml foetal bovine serum (PBS) (Invitrogen)
- **Medio de cultivo:** 500 ml RPMI 1640 medium (Invitrogen)  
50 ml (PBS) (Invitrogen)

### **4. 8. 2) Separación de células mononucleares en sangre periférica (CMSP):**

Para cada ensayo se extrajeron, mediante venopunción, 50 ml de sangre periférica recogida en tubos Vacutainer<sup>TM</sup> que contenían EDTA como anticoagulante.

Se añadieron 5 ml de Histopaque 1077 (Sigma) a 4 tubos Falcon de 15 ml de capacidad y se transfirió la sangre dejándola resbalar lentamente por la pared del tubo.

Tras la centrifugación de los 4 tubos Falcon a una velocidad de 2000 rpm (725g) durante 20 minutos, se creó el siguiente gradiente de densidad: una primera capa de plasma, seguida de una capa algodonosa de CMSPs, otra de Histopaque y por último el resto de células.

En un nuevo tubo de 25 ml de capacidad se añadieron 5 ml de medio de lavado. Con una pipeta Pasteur estéril se aspiraron las CMSPs de la interfaz entre el plasma y el

## MATERIAL Y MÉTODOS

histopaque para añadirlo al tubo que ya contenía los 5ml de medio de lavado. Dicho tubo fue completado hasta alcanzar 25 ml con más medio de lavado.

El primer lavado se completó centrifugando a 1500rpm (400g) durante 5 minutos y decantando el sobrenadante. A continuación, para realizar un segundo lavado, se añadieron otros 25 ml de medio de lavado y se repitieron la centrifugación y la decantación. Después de estos dos lavados, el sedimento se resuspendió en 5 ml de medio de **cultivo**.

### **4. 8. 3) Recuento de células:**

En un tubo eppendorf se pusieron 25  $\mu$ l de CMSPs purificadas y 75  $\mu$ l de solución azul tripan 0.4%.

Para realizar el conteo de células al microscopio se utilizó una cámara Neubauer cargada con 10  $\mu$ l de la solución de CMSPs obtenida en el paso anterior. Únicamente se tuvieron en cuenta las células viables, es decir, aquellas no teñidas por el colorante.

La concentración final de CMSPs buscada era de  $10^6$  células /ml medio de cultivo. Por ello, y conociendo el número de células viables de partida, a los 5 ml iniciales se les añadió la cantidad necesaria de medio de cultivo para obtenerla.

Por último, se puso 1 ml de la misma en cada pocillo de una placa de cocultivo celular. El número de pocillos que se utilizó en cada ensayo dependió del conteo de CMSPs obtenido en cada una de ellos.

### **4. 8. 4) Cultivo de *H. pylori*:**

Utilizando una torunda estéril de algodón se recogieron todas las unidades formadoras de colonias (UFC) de *H. pylori* de un pase de 24 horas en agar sangre en la atmosfera adecuada, y se resuspendieron en 1 ml de RPMI.

La densidad óptica (DO) de cada muestra se midió en el espectrofotómetro (AstraNet) a una longitud de onda de 595nm.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ajustó la concentración de cada suspensión bacteriana a  $2 \times 10^8$  UFC/ml, de forma que al pipetear 100  $\mu$ l en la placa de cocultivo que ya tiene 1 ml de solución celular, la concentración celular sea  **$10^6$  células/ml** y además que haya 20 veces más bacterias que células (Multiplicity Of Infection o MOI de 20), es decir  **$2 \times 10^7$  UFC/ml**.

Cada pocillo de la placa de cocultivo se utilizó para una única cepa. Uno de los pocillos tenía sólo RPMI, actuando como control negativo.

### **4. 8. 5) Comprobación de la concentración bacteriana mediante recuento de colonias de *H. pylori*:**

Se pipetearon 180  $\mu$ l de RPMI en todas las filas de una placa microtiter de 96 pocillos (tantas columnas como muestras se estaban analizando). En la primera fila se añadieron 20  $\mu$ l de cada suspensión bacteriana  $2 \times 10^8$  UFC/ml, diluyendo de esta forma la suspensión a una dilución 1/10. Con una pipeta multicanal se transfirieron 20  $\mu$ l de la primera fila a la segunda y así sucesivamente hasta la octava fila. De esta forma, obtuvimos un gradiente de concentraciones de  $2 \times 10^7$  UFC/ml a 2 UFC/ml para cada una de las soluciones bacterianas.

Para comprobar que efectivamente crecían ese número de UFC, se pipetearon 4 gotas de 20  $\mu$ l de cada una de ellas en placas de agar sangre. Estas placas se incubaron de 3 a 5 días en las condiciones adecuadas, después de los cuales se contó el número de colonias de las 4 gotas y se hizo la media. Así se comprobó que las UFC/ml para cada cepa y en cada una de las concentraciones coincidían con lo esperado (20 000 000 UFC/ml a 2 UFC/ml).

### **4. 8. 6) Obtención del sobrenadante:**

El cocultivo que se incubó durante 48 horas se transfirió a eppendorfs de 1,5 ml para centrifugarlos a máxima velocidad durante 3 minutos. El sobrenadante se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización para detectar la cantidad de IL-12.

#### 4. 8. 7) Detección de IL-12:

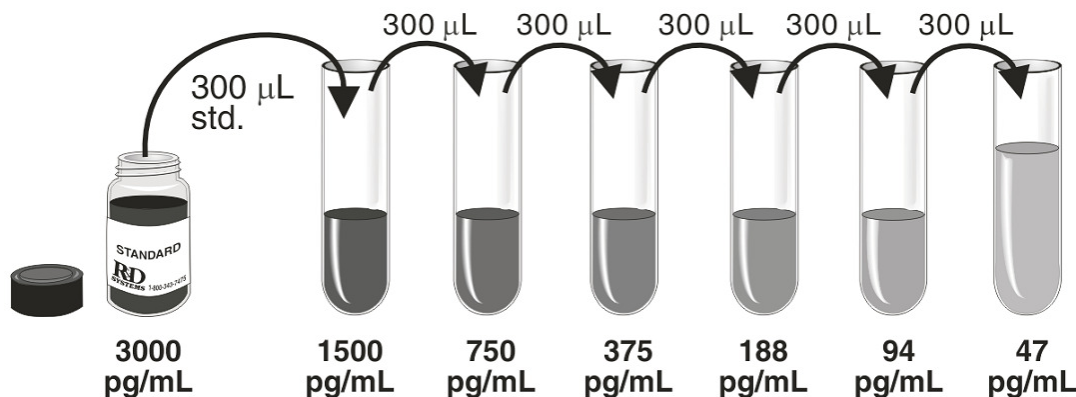
Para detectar y cuantificar los niveles de IL-12 obtenidos tras el co-cultivo, se utilizó un ELISA comercial: **Quantikine® Porcine IL-12/ IL-23 p40 Immunoassay (R & D Systems)**.

El kit está diseñado para detectar la subunidad p40, subunidad común a la IL-12 y a la IL-23, ambas pertenecientes a la familia de las citoquinas IL-12.

El ensayo consiste en un ELISA en fase sólida que contiene anti-anticuerpos (anti-Ac) monoclonales específicos de la subunidad p40 de IL-12/ IL-23 porcina. Estos anti-Ac se encuentran unidos a la microplaca de reacción.

##### 4.8.7.1 Curva de calibrado:

De acuerdo con las instrucciones indicadas por **Quantikine® Porcine IL-12/ IL-23 p40 Immunoassay (R & D Systems)**, a partir del estándar proporcionado en el kit se obtuvieron las diluciones necesarias para la curva de calibrado.



##### 4.8.7.2 Procedimiento:

Siguiendo los pasos indicados por el fabricante, las muestras (previamente diluidas 1/10) fueron incubadas en las microplacas (con los anti-Ac fijados en su base), durante 2 horas en agitación a 50 rpm.

Tras esas 2 horas, se realizaron los lavados necesarios para eliminar los anticuerpos no inmovilizados por los antiAc.

## MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se añadieron subunidades p40 recombinantes unidas a un conjugado enzimático y las placas se incubaron otras 2 horas con la misma agitación.

Al cabo de ese tiempo y tras los lavados pertinentes, las placas fueron incubadas 30 minutos con la solución sustrato y sin agitación.

Tras detener la reacción, la densidad óptica (DO) de cada muestra fue analizada colocando las microplacas en un lector espectrofotométrico a una longitud de onda de 450 nm (**PR 3100TSC Bio Rad**).

Utilizando la curva de calibración obtenida con los estándares durante el ensayo, se calculó la concentración de IL-12 correspondiente a cada valor de DO obtenido.

## **4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows.

Para evaluar el grado de asociación entre variables cualitativas entre sí se utilizó el estadístico Chi cuadrado, considerándose una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p \leq 0,05$ .

Cuando esta asociación fue positiva el riesgo se evaluó mediante Odds Ratio con un índice de confianza del 95%.

La comparación de medias cuantitativas se realizó usando el estadístico t-student, previa comprobación de igualdad de varianzas mediante el test de Levene. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p \leq 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 DATOS GENERALES DE LOS PACIENTES

### ESTUDIADOS:

Se analizaron un total de 80 aislamientos de *Helicobacter pylori* procedentes de biopsias de antro gástrico. Las características de los pacientes de los que estas biopsias fueron obtenidas se resumen en la tabla 5.1.1:

Nº Aislamiento	Nº Laboratorio	Grupo de Edad	Género	País Nacimiento	Tratamiento	Gravedad
1	182001	Niño	Femenino	España	No	Leve
2	187507	Niño	Masculino	España	No	Leve
3	182439	Adulto	Masculino	España	IBP	Sin alterac.
4	182305	Niño	Masculino	España	No	Leve
5	186589	Adulto	Masculino	España	No	Moderada
6	182301	Niño	Femenino	España	No	Leve
7	187508	Niño	Femenino	España	No	Leve
8	188283	Adulto	Femenino	España	No	Sin alterac.
9	187112	Adulto	Masculino	España	No	Leve
10	182090	Niño	Femenino	India	No	Leve
11	187505	Niño	Femenino	España	No	Sin datos
12	187510	Niño	Masculino	Rumania	Sí	Leve
13	181862	Adulto	Femenino	España	No	Sin alterac.
14	188285	Adulto	Masculino	España	IBP	Sin alterac.
15	183532	Niño	Masculino	España	No	Leve
16	182879	Adulto	Femenino	España	No	Sin datos
17	185887	Adulto	Femenino	España	OCA	Sin datos
18	185662	Adulto	Femenino	España	No	Leve
19	183863	Niño	Masculino	Etiopia	OCA	Leve
20	183335	Niño	Masculino	España	No	Leve
21	182881	Adulto	Femenino	España	No	Leve
22	186695	Niño	Femenino	España	Sí	Leve
23	186788	Adulto	Femenino	España	IBP	Sin alterac.
24	184184	Niño	Femenino	España	Sí	Leve
25	182876	Niño	Masculino	España	No	Leve
26	182167	Adulto	Femenino	España	No	Leve
27	185918	Adulto	Femenino	España	IBP	Sin alterac.
28	183989	Adulto	Femenino	España	No	Leve
29	183864	Niño	Masculino	España	No	Leve
30	180354	Adulto	Masculino	España	No	Leve
31	180782	Adulto	Femenino	España	IBP	Sin alterac.
32	173200	Niño	Femenino	España	No	Sin datos
33	191483	Adulto	Masculino	Rumanía	No	Leve
34	181317	Adulto	Femenino	España	No	Sin alterac.
35	180533	Adulto	Femenino	Sudamérica	No	Moderada
36	182164	Adulto	Masculino	España	No	Leve



## RESULTADOS

Nº Aislamiento	Nº Laboratorio	Grupo de Edad	Género	País Nacimiento	Tratamiento	Gravedad
37	180532	Adulto	Femenino	Sudamérica	No	Sin alterac.
38	168867	Adulto	Femenino	Sudamérica	No	Leve
39	191830	Adulto	Femenino	Rumanía	No	Leve
40	189998	Adulto	Masculino	España	IBP	Leve
41	201387	Niño	Masculino	Sudamérica	No	Sin datos
42	178742	Niño	Masculino	Marruecos	Sí	Sin datos
43	172810	Adulto	Femenino	España	No	Leve
44	180901	Adulto	Femenino	España	No	Leve
45	189629	Adulto	Femenino	Sudamérica	No	Leve
46	182878	Adulto	Femenino	España	No	Leve
47	182005	Adulto	Masculino	Rusia	No	Leve
48	191828	Adulto	Masculino	España	No	Sin alterac.
49	166461	Niño	Femenino	Rumanía	No	Sin datos
50	165034	Adulto	Femenino	España	No	Sin alterac.
51	182764	Adulto	Femenino	España	No	Leve
52	183990	Niño	Masculino	España	OCA	Leve
53	183869	Niño	Femenino	Rumanía	Sí	Leve
54	202810	Niño	Masculino	España	No	Sin datos
55	191033	Adulto	Femenino	España	IBP	Sin alterac.
56	190810	Adulto	Femenino	España	No	Sin datos
57	188282	Adulto	Masculino	España	No	Sin alterac.
58	200837	Niño	Masculino	España	No	Leve
59	190806	Niño	Femenino	España	No	Leve
60	183865	Niño	Masculino	España	Sí	Leve
61	183868	Niño	Femenino	España	No	Sin alterac.
62	189205	Adulto	Masculino	España	No	Leve
63	201388	Niño	Femenino	España	No	Sin datos
64	189204	Adulto	Femenino	España	No	Leve
65	3040708	Niño	Femenino	Marruecos	No	Leve
66	3007605	Niño	Masculino	España	No	Leve
67	3021666	Niño	Femenino	España	No	Leve
68	3011607	Niño	Femenino	España	No	Leve
69	3039377	Niño	Femenino	España	No	Leve
70	3042551	Niño	Femenino	España	No	Leve
71	3025297	Niño	Masculino	España	OMA	Leve
72	3037344	Niño	Femenino	España	No	Leve
73	3023725	Niño	Masculino	España	OMA	Sin alterac.
74	3015634	Niño	Masculino	España	OMA	Leve
75	3039375	Niño	Masculino	España	No	Leve
76	3038758	Niño	Femenino	España	No	Sin datos
77	3040288	Niño	Masculino	España	Sin datos	Moderada
78	3040287	Niño	Masculino	Sin datos	Sin datos	Sin datos
79	3043847	Niño	Masculino	Sin datos	Sin datos	Sin datos
80	3044364	Niño	Masculino	Sin datos	Sin datos	Sin datos

**Tabla 5.1.1**

## RESULTADOS

(IBP: Inhibidor Bomba de Protones; OCA: Omeprazol, Claritromicina y Amoxicilina; OMA: Omeprazol, Metronidazol, Amoxicilina; Sin alterac: sin alteraciones)

La distribución de estos pacientes por grupos de edad y de género fue muy homogénea (Tablas 5.1.2 y 5.1.3):

**Edad**

	Frecuencia	Porcentaje
Adultos	37	46,25
Niños	43	53,75
Total	80	100,0

**Tabla 5.1.2**

**Género**

	Frecuencia	Porcentaje
Mujeres	45	56,25
Hombre	35	43,75
Total	80	100,0

**Tabla 5.1.3**

La mayoría de ellos eran de origen español y no habían recibido tratamiento para *H. pylori* previamente (Tablas 5.1.4 y 5.1.5):

**Origen**

	Frecuencia	Porcentaje
España	62	77,5
Extranjero	15	18,75
Sin datos	3	3,75
Total	80	100,0

**Tabla 5.1.4**

**Tratamiento previo**

	Frecuencia	Porcentaje
No	57	71,25
Sí	19	23,75
Sin datos	4	5,0
Total	80	100,0

**Tabla 5.1.5**

En cuanto a las manifestaciones clínicas, se evaluaron los hallazgos endoscópicos e histológicos y en función de la gravedad de los mismos se agruparon de la siguiente manera:

**- Grave:**

Gastritis atrófica, linfoma tipo MALT, cáncer de estómago.

**- Moderada:**

Úlcera gástrica, bulboadenitis erosiva, lesión aftosa prepilórica

## RESULTADOS

### - Leve:

Gastritis crónica superficial, observación endoscópica de nodularidad antral.

### - Sin hallazgos endoscópicos o histológicos significativos (sin alteraciones):

Gastralgia con endoscopia normal.

### Gravedad de los hallazgos

	Frecuencia	Porcentaje
Moderada	3	3,8
Leve	48	<b>60</b>
Sin alteraciones	15	18,8
Sin datos	14	17,5
Total	80	100,0

**Tabla 5.1.6**

Como se indica en la tabla 5.1.6, durante el período de estudio, ningún paciente presentó hallazgos considerados como graves. Por el contrario, la mayoría de los pacientes presentaron alteraciones endoscópicas y/o histológicas de tipo leve.

## 5.2 FACTORES DE VIRULENCIA ANALIZADOS:

### 5. 2. 1) Clásicos:

Desde el reconocimiento de *Helicobacter pylori* como causa de patología digestiva, los factores de virulencia más ampliamente estudiados han sido el gen *vacA* y el gen *cagA*:

N° Aislamiento	<i>vacA</i>				<i>cagA</i>
	<i>vacA s1</i>	<i>vacA s2</i>	<i>vacA m1</i>	<i>vacA m2</i>	
1	-	Positivo	-	Positivo	-
2	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
3	-	Positivo	-	Positivo	-
4	-	Positivo	-	Positivo	-
5	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
6	-	Positivo	-	Positivo	-
7	-	Positivo	-	Positivo	-
8	-	Positivo	-	Positivo	-
9	-	Positivo	-	Positivo	-
10	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo
11	-	Positivo	-	Positivo	-
12	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
13	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
14	-	Positivo	-	Positivo	-
15	-	Positivo	-	Positivo	-
16	Positivo	-	-	Positivo	Positivo
17	-	Positivo	-	Positivo	-
18	Positivo	-	-	Positivo	Positivo
19	-	Positivo	-	Positivo	-
20	-	Positivo	-	Positivo	-
21	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
22	Positivo	-	-	Positivo	Positivo
23	-	Positivo	-	Positivo	-
24	-	Positivo	-	Positivo	-
25	-	Positivo	-	Positivo	-
26	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
27	-	Positivo	-	Positivo	-
28	-	Positivo	-	Positivo	-
29	-	Positivo	-	Positivo	-
30	Positivo	-	-	Positivo	Positivo
31	-	Positivo	-	Positivo	-
32	-	Positivo	-	Positivo	-
33	-	Positivo	-	Positivo	-
34	-	Positivo	-	Positivo	-
35	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
36	-	Positivo	-	Positivo	-
37	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
38	-	Positivo	-	Positivo	-
39	Positivo	-	-	Positivo	Positivo
40	-	Positivo	-	Positivo	-

## RESULTADOS

N° Aislamiento	<i>vacA</i>				<i>cagA</i>
	<i>vacA s1</i>	<i>vacA s2</i>	<i>vacA m1</i>	<i>vacA m2</i>	
41	-	Positivo	Positivo	Positivo	-
42	-	Positivo	-	Positivo	-
43	Positivo	-	-	Positivo	-
44	-	Positivo	-	Positivo	-
45	-	Positivo	-	Positivo	-
46	-	Positivo	-	Positivo	-
47	-	Positivo	Positivo	-	Positivo
48	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
49	Positivo	-	-	Positivo	Positivo
50	-	Positivo	-	Positivo	-
51	-	Positivo	-	Positivo	-
52	-	Positivo	-	Positivo	-
53	Positivo	-	-	Positivo	Positivo
54	-	Positivo	-	Positivo	-
55	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
56	-	Positivo	-	Positivo	-
57	-	Positivo	-	Positivo	-
58	-	Positivo	-	Positivo	-
59	-	Positivo	-	Positivo	-
60	-	Positivo	-	Positivo	-
61	-	Positivo	-	Positivo	-
62	-	Positivo	Positivo	-	-
63	Positivo	-	-	Positivo	Positivo
64	-	Positivo	-	Positivo	-
65	-	Positivo	-	Positivo	-
66	-	Positivo	-	Positivo	-
67	-	Positivo	-	Positivo	-
68	-	Positivo	-	Positivo	-
69	-	Positivo	-	Positivo	-
70	-	Positivo	-	Positivo	-
71	-	Positivo	-	Positivo	-
72	-	Positivo	-	Positivo	-
73	-	Positivo	-	Positivo	-
74	-	Positivo	-	Positivo	-
75	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
76	-	Positivo	-	Positivo	-
77	-	Positivo	-	Positivo	-
78	-	Positivo	-	Positivo	-
79	-	Positivo	-	Positivo	-
80	-	Positivo	-	Positivo	-

**Tabla 5.2.1:** Distribución de genes clásicos en la población estudiada.

## RESULTADOS

### 5.2.1.1 Gen *vacA*:

El gen *vacA*, es un gen constitutivo de la especie *H. pylori*. Por ello fue detectado en todos los aislamientos estudiados. Este gen posee una estructura mosaico que le permite distintas formas de presentación. Así, en base al análisis de la secuencia del extremo 5' del gen (codifica la región señal N-terminal de la proteína) y de la región media (codifica parte de la subunidad de unión a células epiteliales p55), es posible distinguir 4 presentaciones distintas: *s1* y *s2* analizando la secuencia del extremo 5' y *m1* y *m2* analizando la región media.

El análisis de la secuencia *s* se resume en la tabla 5.2.2:

#### *vacA s*

	Frecuencia	Porcentaje
<i>s 1</i>	21	26,25
<i>s 2</i>	59	<b>73,75</b>
Total	80	100,0

Tabla 5.2.2

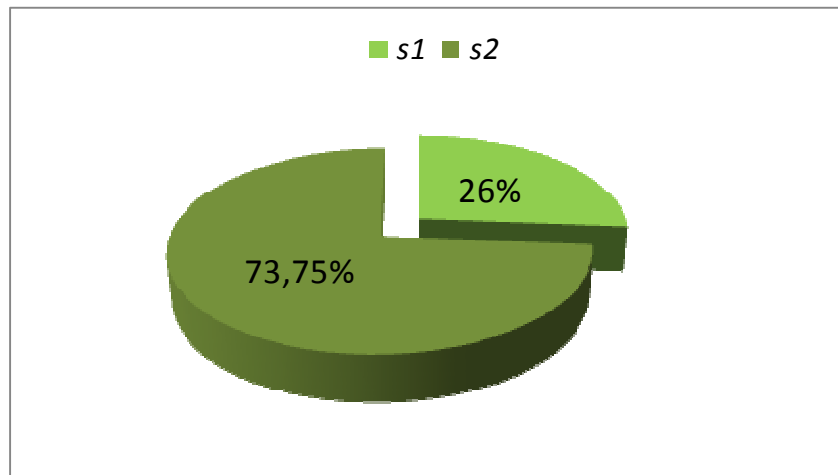


Figura 5.2.1

## RESULTADOS

Casi tres cuartas partes de los aislamientos estudiados presentaron la forma *vacA s2*, relacionada con una menor citotoxicidad. Todas las cepas analizadas fueron detectadas como *s1* o *s2* de forma excluyente. (Figura 5.2.1)

En el caso de *vacA m*, las presentaciones *m1* y *m2* no fueron excluyentes, ya que en 2 aislamientos se detectaron ambas formas simultáneamente. (Tabla 5.2.3)

### *vacA m*

	Frecuencia	Porcentaje
<i>m 1</i>	13	16,25
<i>m 2</i>	65	<b>81,25</b>
<i>m1 m2</i>	2	2,5
Total	80	100,0

Tabla 5.2.3

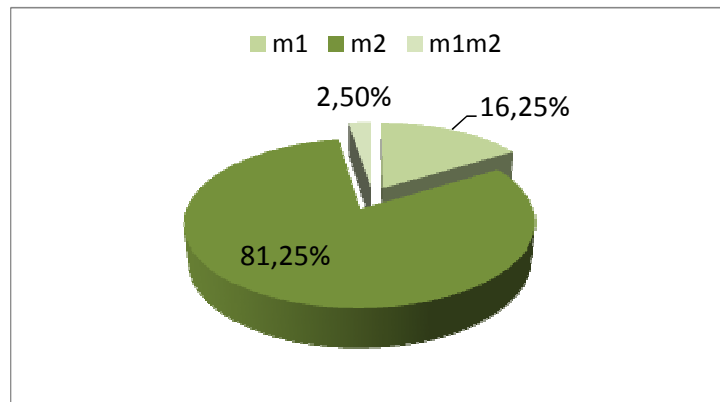


Figura 5.2.2

Más del 80% de los aislamientos presentaron la forma *vacA m2*, relacionada con un menor daño epitelial. (Figura 5.2.2)

La presentación *vacA m1m2*, descrita como una forma con capacidad de vacuolización similar a *vacA m1*, obtuvo un porcentaje del 2,5% en las cepas analizadas durante el estudio.

## RESULTADOS

Por otro lado, se observaron todas las combinaciones posibles entre los fragmentos *s* y *m* (Tabla 5.2.4):

### Gen *vacA*

<i>s1m1</i>	<i>s1m2</i>	<i>s1m1m2</i>	<i>s2m2</i>	<i>s2m1</i>	<i>s2m1m2</i>
13,75% (11/80 cepas)	11,25% (9/80 cepas)	1,25% (1/ 80 cepas)	<b>70%</b> (56/80 cepas)	2,5% (2/ 80 cepas)	1,25% (1/ 80 cepas)

Tabla 5.2.4

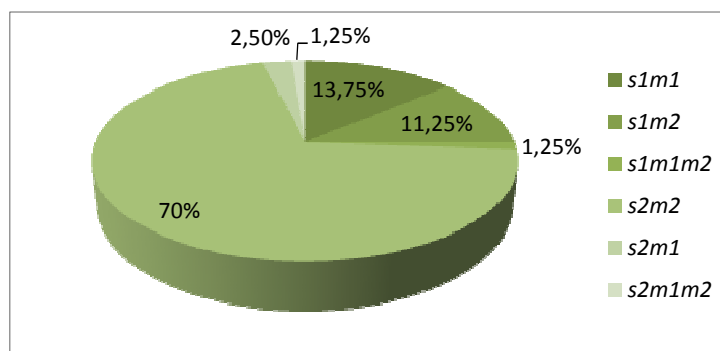


Figura 5.2.3

Las presentaciones relacionadas con una menor patogenicidad (*s2m2*) fueron, por tanto, las más frecuentes con un 70%. (Figura 5.2.3)

Asimismo, la relación observada entre ambos fragmentos, muestra que:

- Existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia de uno u otro fragmento tipo *s* y uno y otro fragmento de tipo *m* (Tabla 5.2.5)

### *vacA s* - *vacA m*

		<i>vacA m</i>		Total
		<i>m 1 ó m1m2</i>	<i>m 2</i>	
<i>vacA s</i>	<i>s 1</i>	12	9	21
	<i>s 2</i>	3	56	59
Total		15	65	80

1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

( $p < 0,001$  mediante Chi cuadrado; OR= 24,889; CI al 95%= 5,851-105,86)

Tabla 5.2.5



## RESULTADOS

- Del total de aislamientos *s1* (21 cepas) el 52,38% eran también *m1*. El resto presentaban la forma *m2* a excepción de una que resultó *m1m2*
- Del total de aislamientos *s2* (59 cepas) el **94,92%** presentó genotipo *m2*. Al igual que en el caso anterior una única cepa resultó *m1m2*.

Esto descarta la presencia de *s1* como predictor de la forma *m1* (sensibilidad= 52,38%), pero propone la forma *s2* como indicador probable del genotipo *m2* (sensibilidad= 94,92%).

### a) Relación con la edad:

#### *vacA s - vacA m*

	<i>vacA</i>						Total
	<i>s1m1m2</i>	<i>s2m1m2</i>	<i>s1m1</i>	<i>s2m1</i>	<i>s1m2</i>	<i>s2m2</i>	
Edad <b>Adultos</b>	0	0	8	2	5	22	37
<b>Niños</b>	1	1	3	0	4	34	43
<b>Total</b>	1	1	<b>11</b>	2	9	<b>56</b>	80

**Tabla 5.2.6**

En la tabla 5.2.6 se observa que los 2 genotipos más prevalentes son el *m1s1* y el *m2s2* (77 casos, que suman un 83,75% entre ambos). Por este motivo se analizó la relación estadística de ambos respecto a la edad de los pacientes:

#### *Edad – vacA s1m1 y s2m2*

	<i>vacA</i>		Total
	<i>s1m1</i>	<i>s2m2</i>	
Edad <b>Adultos</b>	8	22	30
<b>Niños</b>	3	34	37
<b>Total</b>	11	56	67

1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

(**p= 0,041 mediante Chi cuadrado; OR= 4,12; CI al 95%= 0,985-17,242**)

**Tabla 5.2.7**

## RESULTADOS

Se observó (tabla 5.2.7) que los niños estaban, de una forma estadísticamente significativa, colonizados por cepas portadoras del genotipo asociado a una menor patogenicidad, es decir, *vacA s2m2*.

### b) Relación con el género:

#### Género - *vacA*

		<i>vacA</i>						Total
		<i>s1m1m2</i>	<i>s2m1m2</i>	<i>s1m1</i>	<i>s2m1</i>	<i>s1m2</i>	<i>s2m2</i>	
Género	Femenino	1	0	6	0	8	30	45
	Masculino	0	1	5	2	1	26	35
Total		1	1	11	2	9	56	80

Tabla 5.2.8

Como se observa en la tabla 5.2.8, los 2 genotipos más prevalentes son el *m1s1* y el *m2s2* (77 casos, que suman un 83,75% entre ambos). Por ello se analizó la relación estadística de ambos respecto al género de los pacientes:

#### Género – *vacA s1m1* y *s2m2*

		<i>vacA</i>		Total
		<i>s1m1</i>	<i>s2m2</i>	
Género	Femenino	6	30	36
	Masculino	5	26	31
Total		11	56	67

(p= 0,953 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.2.9

Se observó de esta forma (tabla 5.2.9) que el género no estaba estadísticamente relacionado con el genotipo de los aislamientos obtenidos de los distintos pacientes.

## RESULTADOS

### c) Relación con el origen de los pacientes:

#### Origen - *vacA*

		<i>vacA</i>						Total
		<i>s1m1m2</i>	<i>s2m1m2</i>	<i>s1m1</i>	<i>s2m1</i>	<i>s1m2</i>	<i>s2m2</i>	
Origen	Extranjero	1	1	3	1	3	6	15
	Sin datos	0	0	0	0	0	3	3
	Español	0	0	8	1	6	47	62
Total		1	1	11	2	9	56	80

**Tabla 5.2.10**

El número de pacientes que componían cada grupo no resultó estadísticamente significativo (Tabla 5.2.10). Pero, puesto que la región media parece tener una implicación más importante en la interacción con las células gástricas que con la acción tóxica propiamente dicha<sup>73</sup>, se analizó la relación del origen del paciente con la región *vacA s* por separado (Tabla 5.2.11):

#### Origen – *vacA s*

		<i>vacA s</i>		Total
		<i>s 1</i>	<i>s 2</i>	
Origen	Extranjero	7	8	15
	Español	14	48	62
Total		21	56	77

(p= 0,06 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.11**

Esta relación tampoco resultó estadísticamente significativa (Tabla 5.2.11)

## RESULTADOS

### d) Relación con la gravedad de la clínica:

#### Gravedad Clínica – *vacA*

		<i>vacA</i>						Total
		<i>s1m1m2</i>	<i>s2m1m2</i>	<i>s1m1</i>	<i>s2m1</i>	<i>s1m2</i>	<i>s2m2</i>	
Gravedad	Moderada	0	0	2	0	0	1	3
	Leve	1	0	5	2	6	34	48
	Sin alteraciones	0	0	4	0	0	11	15
	Sin datos	0	1	0	0	3	10	14
Total		1	1	11	2	9	56	80

**Tabla 5.2.12**

Sólo 3 pacientes de los 80 fueron clasificados como pacientes con una clínica moderada, y 15 como pacientes sin alteraciones, siendo en ambos casos un número insuficiente para constituir grupos estadísticamente significativos por separado. (Tabla 5.2.12)

Entre los pacientes que presentaron una clínica leve, el genotipo predominante era *vacA s2m2*. Por ello, se analizó la relación estadística entre la presencia de este genotipo y el desarrollo de una patología leve (Tabla 5.2.13):

#### Gravedad Clínica – *vacA s2m2*

		<i>vacA</i>		Total
		<i>m2s2</i>	No <i>s2m2</i>	
Gravedad Clínica	Leve	34	14	48
	No Leve	12	6	18
Total		46	20	66

(p= 0,743 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.13**

Se observó así que las alteraciones endoscópicas y/o histológicas de tipo leve, no estaban relacionadas de una forma estadísticamente significativa con el genotipo de los aislamientos obtenidos en los distintos pacientes.

## RESULTADOS

### 5.2.1.2 Gen *cagA*:

El gen que codifica la proteína CagA, no está presente en su forma completa en todas las cepas de *H. pylori*, lo que permite dividir este microorganismo en dos subpoblaciones diferenciadas en función de la producción o no de la proteína: cepas CagA positivas que se relacionan (al menos en países con una prevalencia moderada) con el desarrollo de úlcera o cáncer gástrico y cepas CagA negativas, relacionadas con un bajo riesgo de desarrollar dichas patologías. La distribución del gen en la población estudiada se resume en la tabla (5.2.14):

#### Gen *cagA*

	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	59	73,75
Positivo	21	26,25
Total	80	100,0

Tabla 5.2.14

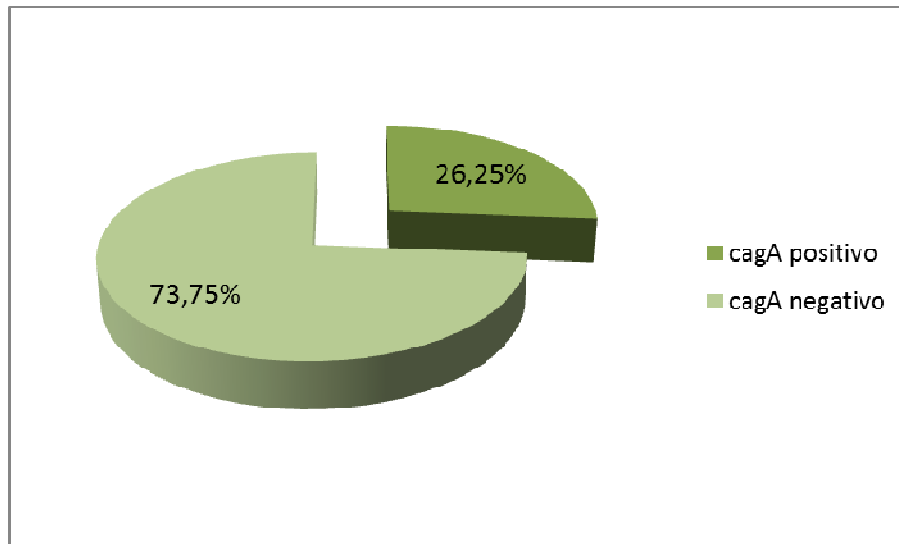


Figura 5.2.4

Casi tres cuartas partes de los aislamientos estudiados resultaron *cagA* negativos, genotipo asociado a una menor patogenicidad. (Figura 5.2.4)

## RESULTADOS

### a) Relación con la edad:

#### Edad - *cagA*

		<i>cagA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Edad	Adultos	24	13	37
	Niños	35	8	43
Total		59	21	80

(p= 0,094 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.15**

Se observó de esta forma (tabla 5.2.15) que la edad no estaba relacionada estadísticamente con la presencia o ausencia del gen *cagA*.

### b) Relación con el género:

#### Género - *cagA*

		<i>cagA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Género	Femenino	31	14	45
	Masculino	28	7	35
Total		59	21	80

(p= 0,263 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.16**

Se observó así que el género tampoco estaba, de una forma estadísticamente significativa, relacionado con la presencia o ausencia del gen *cagA*. (Tabla 5.2.16)

### c) Relación con el origen de los pacientes:

Se excluyeron 3 pacientes de los que no se tenían datos sobre su nacionalidad.

## RESULTADOS

### Origen - *cagA*

		<i>CagA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Origen	Extranjero	7	8	15
	España	49	13	62
Total		56	21	77

( $p = 0,012$  mediante Chi cuadrado; OR= 0,232; CI al 95 % = 0,71-0,759)

**Tabla 5.2.17**

La presencia del gen *cagA* se relacionó estadísticamente con el origen: los pacientes nacidos en España tenían un riesgo menor de estar colonizados por cepas portadoras del gen *cagA* (Tabla 5.2.17).

#### d) Relación con la gravedad de la clínica:

### Gravedad Clínica - *cagA*

		<i>cagA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Gravedad Clínica	Moderada	1	2	3
	Leve	36	12	<b>48</b>
	Sin alteraciones	11	4	15
	Sin datos	11	3	14
Total		59	21	80

**Tabla 5.2.18**

Sólo 3 pacientes de los 80 fueron clasificados como pacientes con una clínica moderada, y 15 como pacientes con sin alteraciones, siendo en ambos casos un número insuficiente para constituir grupos estadísticamente significativos por separado. (Tabla 5.2.18)

Por ello, se analizó la relación estadística entre la presencia o ausencia del gen *cagA* y el desarrollo de una patología leve. (Tabla 5.2.19)

## RESULTADOS

### Gravedad Leve – *cagA*

	<i>cagA</i>		Total
	Negativo	Positivo	
Gravedad Clínica Leve	36	12	48
Gravedad Clínica No Leve	12	6	18
Total	48	18	66

1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

(p= 0,498 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.19**

Se observó así que la gravedad clínica leve tampoco estaba, de una forma estadísticamente significativa, relacionada con la presencia o ausencia del gen *cagA*.

#### 5.2.1.3 Relación entre *vacA* y *cagA*:

Los genes *vacA* y *cagA* han sido ampliamente estudiados así como su efecto sobre la mayor o menor capacidad patogénica de *H. pylori*. Los genotipos más patogénicos parecen ser aquellos que presentan el gen *cagA* positivo y al mismo tiempo la forma *s1* para el gen *vacA*. En el presente estudio, la relación entre ambos se describe en la tabla 5.2.20:

### *vacA s - cagA*

	CagA		Total
	Negativo	Positivo	
<i>vacA s</i> s 1	1	20	21
<i>vacA s</i> s 2	58	1	59
Total	59	21	80

**Tabla 5.2.20**

La correlación entre ambos factores (*s1* y *cagA* positivo) es casi completa (95,24%) y presenta una dependencia estadísticamente significativa

(p< 0, 001 mediante Chi cuadrado; OR= 0,001; CI al 95%= 0,000-0,014).



## RESULTADOS

La relación observada entre la presencia de ambos factores de riesgo y la gravedad clínica se describe en la tabla 5.2.21:

### Gravedad Clínica – *vacA s/ cagA*

		<i>vacA s/CagA +</i>		Total
		No <i>s1/cagA -</i>	<i>s1/cagA +</i>	
Gravedad Clínica	Leve	43	5	48
	Moderada	1	2	3
	Sin alteraciones	11	4	15
	Sin datos	14	0	14
Total		69	11	80

**Tabla 5.2.21**

Sólo 3 pacientes de los 80 fueron clasificados como pacientes con una clínica moderada, y 15 como pacientes sin alteraciones, siendo en ambos casos un número insuficiente para constituir grupos estadísticamente significativos por separado. Por ello, se analizó la relación estadística entre la presencia o ausencia del genotipo más patógeno (*s1* y *cagA +*) y el desarrollo de una patología leve. (Tabla 5.2.22)

### Gravedad Leve – *vacA s/cagA*

		<i>vacA s1/CagA +</i>		Total
		No <i>s1/cagA -</i>	<i>s1/cagA +</i>	
Gravedad Clínica	Leve	43	5	48
	No Leve	12	6	18
Total		55	11	66

1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

( $p = 0,026$  mediante Chi cuadrado; OR= 4,33; CI al 95%= 1,117-16,559)

**Tabla 5.2.22**

Estos resultados indican que la combinación “no *s1/cagA -*” es la más probable en pacientes con patología leve de una forma estadísticamente significativa.

# RESULTADOS

## 5. 2. 2) Otros factores de virulencia:

N° Aislamiento	<i>dupA</i>	<i>homA/B</i>		<i>jhp0562/3</i>	
		<i>homA</i>	<i>homB</i>	<i>jhp0562</i>	<i>jhp0563</i>
1	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo
2	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
3	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	-	Positivo	-	-
5	Positivo	Positivo	-	-	-
6	Positivo	-	Positivo	-	-
7	Positivo	-	Positivo	-	-
8	-	-	-	-	-
9	Positivo	Positivo	-	Positivo	Positivo
10	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
11	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
12	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo
13	Positivo	Positivo	-	-	-
14	Positivo	Positivo	-	-	-
15	Positivo	-	Positivo	-	-
16	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo
17	Positivo	Positivo	-	Positivo	Positivo
18	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo
19	Positivo	Positivo	-	-	Positivo
20	Positivo	Positivo	-	-	-
21	Positivo	Positivo	-	Positivo	Positivo
22	-	-	Positivo	Positivo	Positivo
23	-	Positivo	-	-	Positivo
24	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
25	-	-	Positivo	-	-
26	Positivo	Positivo	-	-	Positivo
27	Positivo	Positivo	-	-	-
28	Positivo	Positivo	-	-	-
29	-	Positivo	-	-	-
30	-	-	Positivo	-	Positivo
31	-	-	Positivo	Positivo	-
32	-	-	Positivo	Positivo	-
33	-	-	Positivo	-	Positivo
34	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
35	-	-	Positivo	-	Positivo
36	-	-	Positivo	Positivo	-
37	-	Positivo	-	-	Positivo
38	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
39	-	-	Positivo	-	-
40	-	Positivo	-	Positivo	-
41	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo
42	-	-	Positivo	-	-
43	Positivo	-	Positivo	-	Positivo
44	Positivo	-	-	Positivo	-
45	Positivo	-	Positivo	Positivo	-

## RESULTADOS

N° Aislamiento	<i>dupA</i>	<i>homA/B</i>		<i>jhp0562/63</i>	
		<i>homA</i>	<i>homB</i>	<i>jhp0562</i>	<i>jhp0563</i>
47	-	-	Positivo	Positivo	Positivo
48	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo
49	-	-	-	Positivo	Positivo
50	-	-	Positivo	-	-
51	-	-	Positivo	-	-
52	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
53	-	-	Positivo	Positivo	Positivo
54	-	Positivo	-	-	-
55	-	-	-	Positivo	Positivo
56	-	-	Positivo	-	-
57	-	Positivo	-	-	-
58	-	Positivo	-	-	-
59	-	-	Positivo	-	-
60	-	Positivo	-	-	-
61	-	Positivo	-	-	-
62	Positivo	Positivo	-	Positivo	Positivo
63	-	-	Positivo	Positivo	Positivo
64	-	-	Positivo	-	-
65	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
66	-	Positivo	-	-	-
67	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
68	-	Positivo	-	-	-
69	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
70	-	Positivo	-	-	-
71	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
72	-	-	Positivo	Positivo	Positivo
73	-	Positivo	-	-	-
74	-	Positivo	-	-	-
75	Positivo	Positivo	-	Positivo	Positivo
76	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
77	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
78	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
79	-	Positivo	-	Positivo	Positivo
80	-	Positivo	-	Positivo	Positivo

**Tabla 5.2.23:** Distribución de otros factores de virulencia en la población estudiada.

### 5.2.2.1 Gen *dupA*:

Las primeras hipótesis proponían una asociación positiva de este gen con la úlcera duodenal y negativa, por tanto, con el cáncer gástrico. Sin embargo estudios posteriores encontraron resultados diversos en función de factores como por ejemplo la situación geográfica o la edad.

## RESULTADOS

Tras el diseño de primers específicos para este gen en cepas españolas los resultados en la población analizada se resumen en la tabla 5.2.24:

### Gen *dupA*

	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	52	65,0
Positivo	28	<b>35,0</b>
Total	80	100,0

Tabla 5.2.24

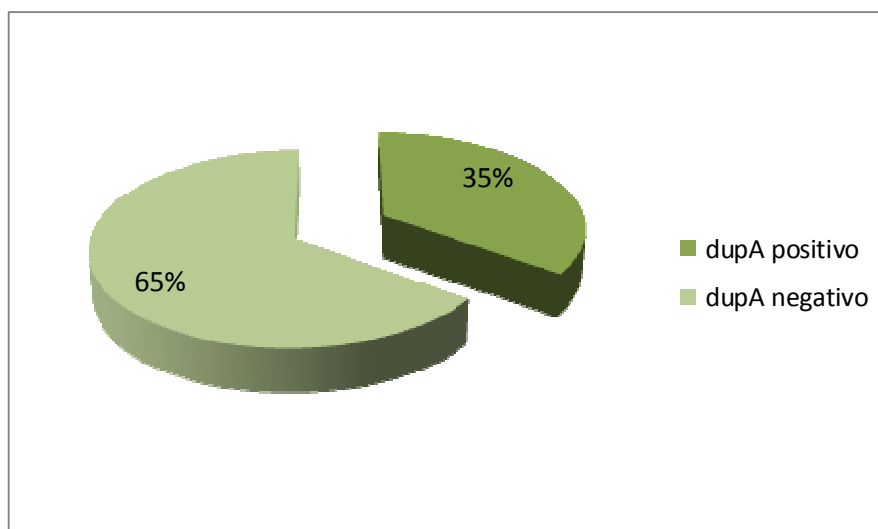


Figura 5.2.5

Un 35% de los aislamientos estudiados resultaron *dupA* positivos. (Figura 5.2.5)

### a) Relación con la edad:

#### Edad – Gen *dupA*

		<i>dupA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Edad	Adultos	20	17	37
	Niños	32	11	43
Total		52	28	80

( $p = 0,057$  mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.2.25

## RESULTADOS

Entre los pacientes adultos el porcentaje de aislamientos *dupA* positivos fue del 45,95% (17 de 37 adultos), mientras que en la población pediátrica este porcentaje fue del 25,58% (11 de 43 niños). A pesar de esta diferencia, el análisis estadístico de la relación presencia del gen / edad no resultó significativo en el presente estudio (Tabla 5.2.25)

### b) Relación con el género:

#### Género – Gen *dupA*

		<i>dupA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Género	Femenino	30	15	45
	Masculino	22	13	35
Total		52	28	80

(p= 0, 723 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.26**

Como indica la tabla 5.2.26, la distribución del gen *dupA* entre los aislamientos de la población analizada es independiente del género de cada uno de los pacientes.

### c) Relación con el origen de los pacientes:

Se excluyeron 3 pacientes de los que no se tenían datos sobre su nacionalidad.

#### Origen - *dupA*

		<i>dupA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Origen	Extranjero	11	4	15
	España	38	24	62
Total		49	28	77

(p= 0, 384 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.27**

El origen de los pacientes no influyó en la distribución del gen *dupA* (Tabla 5.2.27).

## RESULTADOS

### d) Relación con la gravedad de la clínica:

#### Gravedad Clínica - Gen *dupA*

		<i>dupA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Gravedad Clínica	Moderada	2	1	3
	Leve	30	18	48
	Sin alteraciones	10	5	15
	Sin datos	10	4	14
Total		52	28	80

**Tabla 5.2.28**

Sólo 3 pacientes de los 80 estudiados fueron clasificados como pacientes con una clínica moderada, siendo un número insuficiente para constituir un grupo estadísticamente significativo por separado. El resto de pacientes presentaron una clínica leve o no presentaron alteraciones. (Tabla 5.2.28) Fue en estos pacientes donde se analizó si la presencia o ausencia del gen *dupA* presentaba alguna relación estadísticamente significativa con el desarrollo de un tipo u otro de clínica.

#### Gravedad Clínica – Gen *dupA*

		<i>dupA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Gravedad Clínica	Leve	30	18	48
	Sin alteraciones	10	5	15
Total		40	23	63

(p= 0, 770 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.29**

Según indica la tabla 5.2.29, en el presente estudio no se observó una relación estadísticamente significativa entre el genotipo *dupA* positivo y el desarrollo de una clínica leve o sin alteraciones.

## RESULTADOS

### e) Relación con factores de virulencia clásicos:

#### *cagA – dupA*

		<i>dupA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
<i>cagA</i>	Negativo	40	19	59
	Positivo	12	9	21
Total		52	28	80

(p= 0, 379 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.30**

#### *vacA - dupA*

		<i>dupA</i>		Total
		Negativo	Positivo	
<i>vacA</i>	<i>s1</i>	11	10	21
	<i>s2</i>	41	18	59
Total		52	28	80

(p= 0, 158 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.31**

No se observó una relación estadísticamente significativa de *dupA* con los factores de virulencia clásicos. (Tablas 5.2.30 y 5.2.31)

## RESULTADOS

### 5.2.2.2 Gen *homB*:

Este gen codifica una proteína de membrana relacionada con la capacidad de adherencia y con las propiedades proinflamatorias de *H. pylori*. El gen *homA*, relacionado con patología no ulcerosa, también fue estudiado. Los resultados en la población analizada se resumen en la tabla 5.2.32:

#### Gen *hom A/B*

	Frecuencia	Porcentaje
A	42	52,5
B	34	42,5
Negativo	4	5,0
Total	80	100,0

Tabla 5.2.32

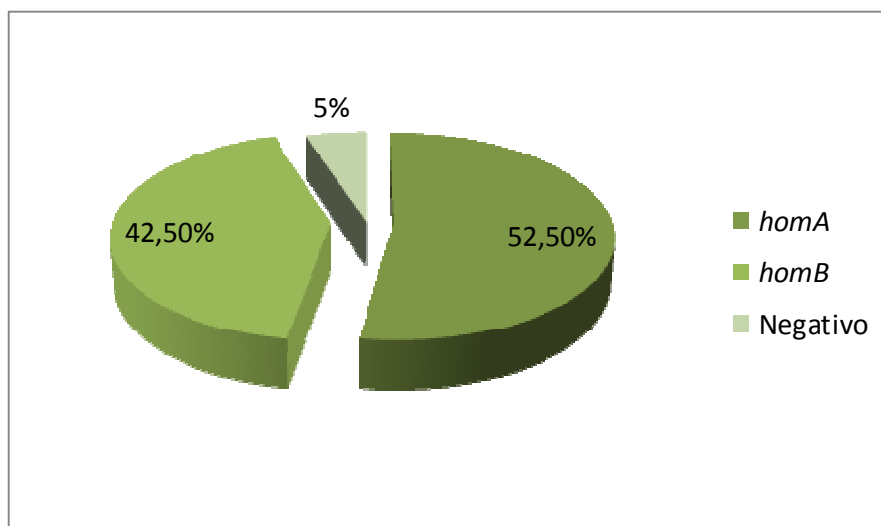


Figura 5.2.6

La proporción entre aislamientos portadores del gen *homB* y el de portadores del gen *homA* fue similar. Solo un 5% no presentaron ninguno de ellos. (Figura 5.2.6)



## RESULTADOS

### a) Relación con la edad:

#### Edad – Gen *homA*/Gen *homB*

		Hom			Total
		A	B	Negativos	
Edad	Adultos	16	18	3	37
	Niños	26	16	1	43
Total		42	34	4	80

Tabla 5.2.33

4 pacientes presentaban aislamientos que no portaban ninguno de los dos genes, siendo un número insuficiente para constituir un grupo estadísticamente significativo por separado. El resto de pacientes presentaron uno de los dos genes. (Tabla 5.2.33) Analizando en estos pacientes la presencia de uno u otro con la edad del paciente no se halló relación estadísticamente significativa ( $p=0,196$  mediante Chi cuadrado).

### b) Relación con el género:

#### Género – Gen *homA*/Gen *homB*

		Hom			Total
		A	B	Negativo	
Género	Femenino	19	22	4	45
	Masculino	23	12	0	35
Total		42	34	4	80

Tabla 5.2.34

El análisis, al igual que en el estudio de la relación con la edad, se realizó sobre aquellos pacientes que presentaron uno de los dos genes, excluyendo los 4 que fueron negativos para ambos (Tabla 5.2.34).

Se puede afirmar que en el presente estudio no se observó una relación estadísticamente significativa entre los genes *homA* y *homB* y el género del paciente ( $p=0,090$  mediante Chi cuadrado).

## RESULTADOS

### c) Relación con el origen de los pacientes:

Se excluyeron 3 pacientes de los que no se tenían datos sobre su nacionalidad (Tabla 5.2.35):

#### Origen – Gen *homA*/Gen *homB*

		<i>Hom</i>			Total
		Negativo	<i>A</i>	<i>B</i>	
Origen	Extranjero	1	5	9	15
	España	3	34	25	62
Total		4	39	34	77

Tabla 5.2.35

Excluyendo los 4 aislamientos que fueron negativos para ambos genes y que no constituían un grupo estadísticamente significativo, se observó que el origen no influía en la distribución de dichos genes ( $p = 0,139$  mediante Chi cuadrado)

### d) Relación con la gravedad de la clínica:

#### Gravedad Clínica – Gen *homA*/Gen *homB*

		<i>hom</i>			Total
		Ninguno	<i>A</i>	<i>B</i>	
Gravedad Clínica	Moderada	0	2	1	3
	Leve	1	25	22	48
	Sin alteraciones	2	9	4	15
	Sin datos	1	6	7	14
Total		4	42	34	80

Tabla 5.2.36

De nuevo 4 pacientes presentaban aislamientos que no portaban ninguno de los dos genes, siendo un número insuficiente para constituir un grupo estadísticamente significativo por separado. Además 3 pacientes fueron clasificados como pacientes con gravedad clínica moderada y tampoco fueron suficientes para formar un grupo estadísticamente significativo. El resto de pacientes presentaron uno de los dos genes y se clasificaron como pacientes con patología leve o sin alteraciones. (Tabla 5.2.36). Fue

## RESULTADOS

en estos pacientes donde se analizó si la presencia de uno u otro gen presentaba alguna relación estadísticamente significativa con la clínica desarrollada por cada paciente.

### Gravedad Clínica Leve/ Sin alteraciones – Gen *homA*/Gen *homB* sin negativos

		<i>hom</i>		Total
		<i>A</i>	<i>B</i>	
Gravedad Clínica	Leve	25	22	47
	Sin alteraciones	9	4	13
Total		34	26	60

(p= 0, 302 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.37**

Se puede afirmar que en el presente estudio no se observó una relación estadísticamente significativa entre el genotipo *homA/B* y el desarrollo de una clínica leve o sin alteraciones. (Tabla 5.2.37)

### e) Relación con factores de virulencia clásicos:

#### *cagA* – *homB*

		<i>homB</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>cagA</i>	Negativo	23	36	59
	Positivo	11	10	21
Total		34	46	80

(p= 0, 286 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.38**

#### *vacA* – *homB*

		<i>homB</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>vacA</i>	<i>s1</i>	11	10	21
	<i>s2</i>	23	36	59
Total		34	46	80

(p= 0, 286 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.39**

## RESULTADOS

No se observó una relación estadísticamente significativa del gen *homB* con los factores de virulencia clásicos. (Tablas 5.2.38 y 5.2.39)

### 5.2.2.3 Gen *jhp0562*:

Este gen codifica una glicotransferasa implicada en la síntesis del lipopolisacárido y que ha sido relacionada con la úlcera péptica. La presencia del gen *jhp5063*, que presenta un 80% de similitud con el gen *jhp5062*, también fue analizada. Los resultados se resumen en la tabla 5.2.40:

#### Gen *jhp0562*

	Frecuencia	Porcentaje
Ambos	30	37,5
<i>jhp0563</i>	36	45,0
<i>jhp0562</i>	13	16,25
Negativo	1	1,25
Total	80	100,0

Tabla 5.2.40

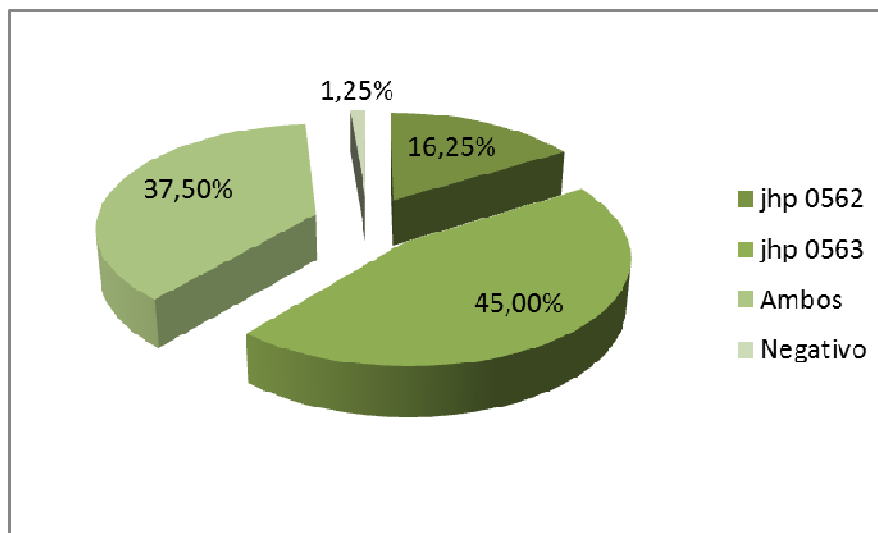


Figura 5.2.7

## RESULTADOS

La mayor parte de los aislamientos presentan el gen *jhp 5063* (45%) o ambos (37,5%). El gen *jhp 5062* está presente en más de la mitad de los aislamientos (53,75%) pero de forma exclusiva sólo alrededor del 16%. En una única cepa no se detectó ninguno de los dos genes. (Figura 5.2.7)

### a) Relación con la edad:

#### Edad – Gen *jhp0562/3*

		<i>jhp0562/3</i>				Total
		Ambos	<i>jhp0563</i>	<i>jhp0562</i>	Negativo	
Edad	Adultos	14	17	5	1	37
	Niños	16	19	8	0	43
Total		30	36	13	1	80

Tabla 5.2.41

En un único paciente no se detectó ninguno de los dos genes, siendo un número insuficiente para constituir un grupo estadísticamente significativo por separado. El resto de pacientes presentaron uno de los dos genes o ambos. (Tabla 5.2.41). Fue en estos pacientes donde se analizó si la presencia de uno u otro gen presentaba alguna relación estadísticamente significativa con la edad de cada paciente ( $p=0,319$  mediante Chi cuadrado). La distribución de ambos genes entre los aislamientos de la población analizada fue independiente de la edad.

### b) Relación con el género:

#### Género – Gen *jhp0562/3*

		<i>jhp0562/3</i>				Total
		Ambos	<i>jhp0563</i>	<i>jhp0562</i>	Negativo	
Género	Femenino	18	19	7	1	45
	Masculino	12	17	6	0	35
Total		30	36	13	1	80

Tabla 5.2.42

## RESULTADOS

El análisis estadístico se realizó excluyendo el único paciente para el que no se detectó ninguno de los dos genes (Tabla 5.2.42):  $p=0,832$  mediante Chi cuadrado. Lo que indica que en el presente estudio no se observó ninguna relación estadísticamente significativa entre la presencia de uno y otro gen con el género del paciente.

### c) Relación con el origen de los pacientes:

Se excluyeron 3 pacientes de los que no se tenían datos sobre su nacionalidad (Tabla 5.2.43):

#### Origen – *jhp0562/3*

		<i>jhp0562/3</i>				Total
		Ambos	<i>jhp0563</i>	<i>jhp0562</i>	Negativos	
Origen	Extranjero	10	3	2	0	15
	España	22	30	9	1	62
Total		32	33	11	1	77

Tabla 5.2.43

La relación entre el origen y la presencia o ausencia del gen *jhp0562* se expone a continuación:

#### Origen – *jhp0562*

		<i>jhp0562</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Origen	Extranjero	3	12	15
	España	34	28	62
Total		37	40	77

( $p=0,015$  mediante Chi cuadrado; OR= 0,206; CI al 95%= 0,053-0,803)

Tabla 5.2.44

La presencia del gen *jhp0562* se relacionó estadísticamente con el origen: los pacientes nacidos fuera de España tenían un riesgo mayor de estar colonizados por cepas portadoras de este gen (Tabla 5.2.44).

## RESULTADOS

### d) Relación con la gravedad de la clínica:

#### Gravedad Clínica – Gen *jhp0562/3*

		<i>jhp0562/3</i>				Total
		Ambos	<i>jhp0563</i>	<i>jhp0562</i>	Negativo	
Gravedad Clínica	Leve	18	23	7	0	48
	Moderada	1	1	1	0	3
	Sin alteraciones	5	8	1	0	14
	Sin datos	6	4	4	1	15
Total		30	36	13	1	80

**Tabla 5.2.45**

En un único paciente no se detectó ninguno de los dos genes, siendo un número insuficiente para constituir un grupo estadísticamente significativo por separado. Además 3 pacientes fueron clasificados como pacientes con gravedad clínica moderada y tampoco fueron suficientes para formar un grupo estadísticamente significativo. El resto de pacientes presentaron uno o ambos genes y se clasificaron como pacientes con patología leve o sin alteraciones. (Tabla 5.2.45)

Fue en estos pacientes donde se analizó si la presencia de uno u otro gen presentaba alguna relación estadísticamente significativa con la clínica desarrollada por cada paciente.

#### Gravedad leve/sin alteración – Gen *jhp0562/3* sin negativos

		<i>jhp0562/3</i>			Total
		Ambos	<i>jhp0563</i>	<i>jhp0562</i>	
Gravedad Clínica	Leve	18	23	7	48
	Sin alteraciones	5	8	1	14
Total		23	31	8	62

(p= 0,719 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.46**

Como indica la tabla 5.2.46, la presencia de uno y otro gen tampoco está estadísticamente relacionada con el desarrollo de patología leve o sin alteraciones.

## RESULTADOS

### e) Relación con factores de virulencia clásicos:

#### *cagA – jhp0562*

		<i>jhp0562</i>		Total
		Negativo	Positivo	
<i>cagA</i>	Negativo	34	25	59
	Positivo	3	18	21
Total		37	43	80

(p= 0,001 mediante Chi cuadrado; OR= 8,16; CI al 95 % = 5,165-30,756)

Tabla 5.2.47

#### *vacA – jhp0562*

		<i>jhp0562</i>		Total
		Negativo	Positivo	
<i>vacA</i>	s1	4	17	21
	s2	33	26	59
Total		37	43	80

(p= 0, 004 mediante Chi cuadrado; OR= 0,185; CI al 95 % = 0,56-0,618)

Tabla 5.2.48

La presencia de este nuevo factor de virulencia se asoció significativamente con la presencia del gen *cagA* y la forma s1 del gen *vacA*. (Tablas 5.2.47 y 5.2.48)



## RESULTADOS

### 5. 2. 3) Relación entre todos los factores de virulencia analizados:

Los genes más prevalentes en la población estudiada fueron *jhp0562* y *homB* (Tabla

5.2.49, Figura 5.2.8):

Factores de Virulencia	Prevalencias
<i>sI</i> (n=21)	26,25%
<i>cagA</i> (n=21)	26,25%
<i>dupA</i> (n=28)	35%
<i>homB</i> (n=34)	42,50%
<i>jhp0562</i> (n=43)	53,75%

Tabla 5.2.49

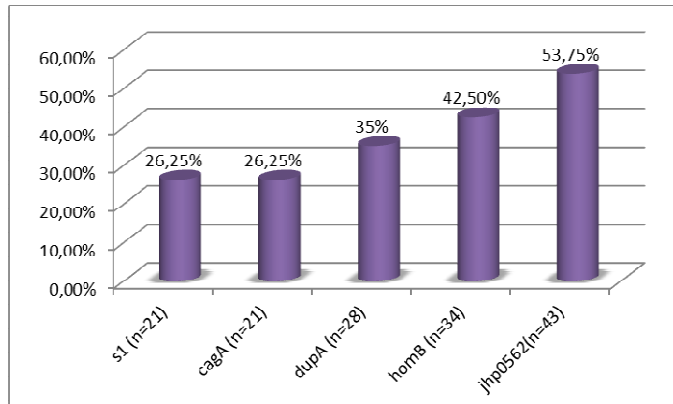


Figura 5.2.8

Estos genes se agruparon según indican la tabla 5.2.50:

Nº Factores de Virulencia	Porcentajes
Sin F. de Virulencia (n=13)	16,25%
1 F. de Virulencia (n=30)	37,50%
2 F. de Virulencia (n=11)	13,75%
3 F. de Virulencia (n=13)	16,25%
4 F. de Virulencia (n=9)	11,25%
5 F. de Virulencia (n=4)	5%

Tabla 5.2.50

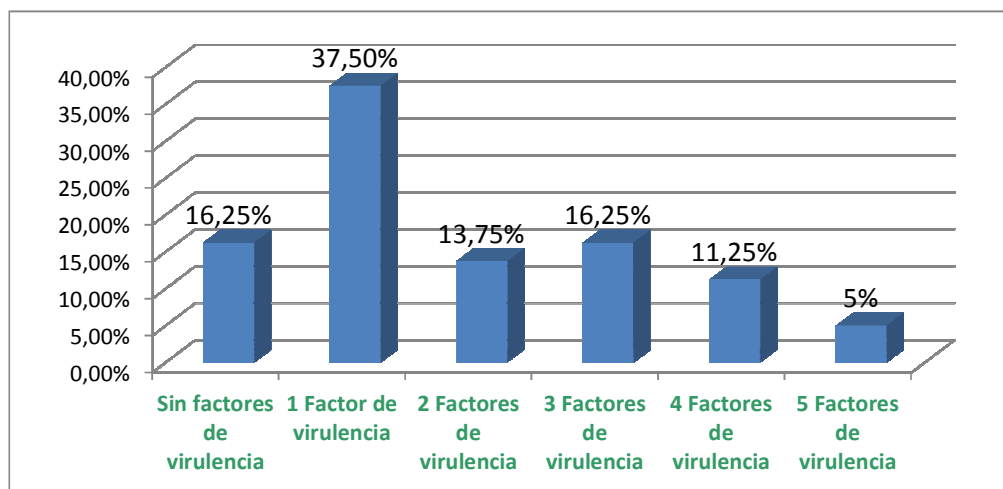


Figura 5.2.9

## RESULTADOS

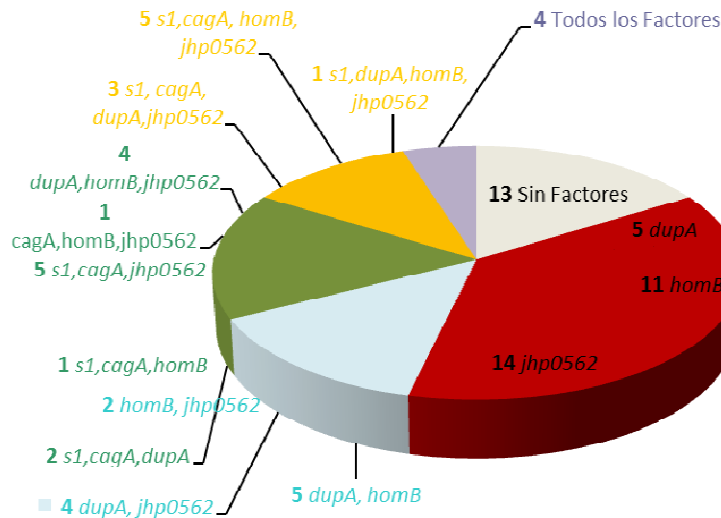
Más del 37% de los aislamientos presentaban un solo gen de los analizados. (Figura 5.2.9)

Más detalladamente, la distribución observada se muestra en la tabla 5.2.51:

Factores de Virulencia	N° Aislamientos
Sin Factores	13
<i>dupA</i>	5
<i>homB</i>	11
<i>jhp0562</i>	14
<i>dupA, homB</i>	5
<i>dupA, jhp0562</i>	4
<i>homB, jhp0562</i>	2
<i>sI, cagA, dupA</i>	2
<i>sI, cagA, homB</i>	1
<i>sI, cagA, jhp0562</i>	5
<i>cagA, homB, jhp0562</i>	1
<i>dupA, homB, jhp0562</i>	4
<i>sI, cagA, dupA, jhp0562</i>	3
<i>sI, cagA, homB, jhp0562</i>	5
<i>sI, dupA, homB, jhp0562</i>	1
Todos los factores	4

**Tabla 5.2.51**

## RESULTADOS



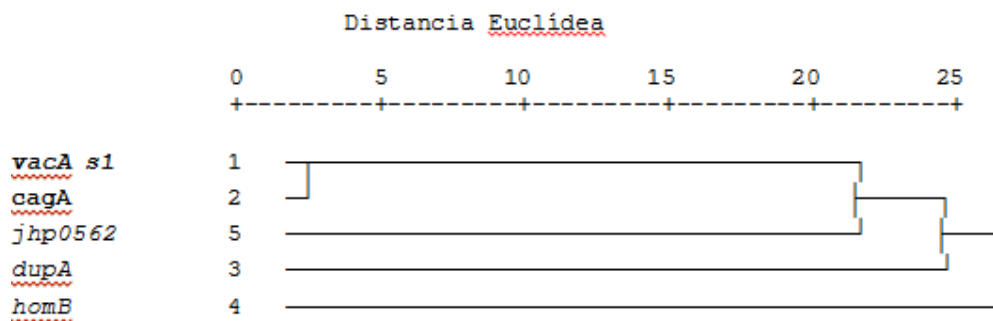
**Figura 5.2.10**

De forma que, como se muestra en la figura 5.2.10:

- El gen prevalente cuando sólo uno de ellos estaba presente fue *jhp0562*.
- Cuando dos genes estaban presentes, un 45,45% presentaban el genotipo *dupA-homB*.
- La presentación *s1, cagA, jhp0562* se observó en un 38,47% de los aislamientos con 3 genes presentes en su ADN.
- Entre los aislamientos con cuatro de los cinco genes presentes, más del 50% resultaron positivos para todos los genes excepto el gen *dupA*.
- 4 de los 80 aislamientos fueron positivos para los cinco genes estudiados.

Para evaluar cómo se asociaban los 5 factores de virulencia en el conjunto de la población estudiada, se realizó un dendrograma mediante el método Average Linkage (Figura 5.2.11):

## RESULTADOS



**Figura 5.2.11**

Se observó que los factores más intensamente relacionados fueron la presencia de los genes *vacAs1* y *cagA*, seguida de la triple combinación *vacA s1*, *cagA* y *jhp0562*. Es decir, se confirma la asociación observada previamente entre estos tres genes.

### 5.2.3.1 Relación con los factores de virulencia:

Analizando la influencia que la distribución de los factores de virulencia estudiados podría tener en la clínica desarrollada por los pacientes se observó:

#### Nº Factores - Gravedad Clínica

		Gravedad Clínica				Total
		Moderada	Leve	Sin alteraciones	Sin datos	
Nº Factores	Ninguno	0	8	4	1	13
	1Factor	1	16	6	7	30
	2Factores	0	10	0	1	11
	3Factores	1	5	4	3	13
	4Factores	1	7	0	1	9
	5Factores	0	2	1	1	4
Total		3	48	15	14	80

**Tabla 5.2.52**

48 de los 80 aislamientos correspondían a pacientes con una clínica leve. Y de ellos 34 presentaban menos de 2 factores de virulencia simultáneamente. (Tabla 5.2.52). Se analizó, si este hecho tenía significancia estadística:

## RESULTADOS

### Nº Factores - Gravedad Leve

		Gravedad Clínica		Total
		Leve	Moderada/Sin alteración	
Nº Factores	Más de 2 F. de Virulencia	14	7	21
	2 ó menos F. de Virulencia	34	11	45
Total		48	18	66

(p= 0, 450 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.53**

Un 70,83% (34 de 45) de los pacientes con clínica leve fueron positivos para 2 ó menos factores de virulencia. Sin embargo, esta relación no resultó estadísticamente significativa. (Tabla 5.2.53)

#### **5.2.3.2 Relación con el origen de los pacientes:**

Tampoco se asoció la gravedad clínica con el origen de los pacientes (Tabla 5.2.54):

### Origen - Gravedad Clínica

		Gravedad Clínica		Total
		Leve	Sin alteraciones	
Origen	Extranjero	10	1	11
	España	38	14	52
Total		48	15	63

(p= 0, 207 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.2.54**

Sin embargo, cuando se analizó la asociación entre el número de factores de virulencia presentes en cada aislamiento y el origen de los pacientes (Tabla 5.2.55), esta asociación si resultó significativa:

## RESULTADOS

### Origen - F. virulencia

		F. virulencia		Total
		Más de 2 F. de virulencia	Menos de 2 F. de virulencia	
Origen	Extranjero	9	6	15
	España	17	45	62
Total		26	51	77

(p= 0,017 mediante Chi cuadrado; OR= 3,971; CI al 95% = 1,227-12,845)

**Tabla 5.2.55**

Aquellos pacientes nacidos en España tenían un menor riesgo de estar colonizados por cepas portadoras de más de 2 factores de virulencia.

## 5.3 PRODUCCIÓN DE INTERLEUCINA 12:

### 5. 3. 1) Resultados del cocultivo de los aislamientos de *Helicobacter pylori* y células mononucleares de sangre periférica:

#### 5.3.1.1 Contaje de células mononucleares de sangre periférica:

Se extrajeron alrededor de 150 ml de sangre periférica en tres días diferentes y con dos donantes distintos: **A** y **B**. El donante **A** resultó positivo para la detección de antígeno en heces de *Helicobacter pylori*, mientras que el donante **B**, que había sido tratado años antes, resultó negativo para la misma prueba.

Tras el proceso de selección y concentración de células mononucleares los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.3.1:

Día	Células/ml del concentrado	Donante
1	15 730 000	<b>A</b>
2	1 460 000	<b>A</b>
3	7 190 000	<b>B</b>

**Tabla 5.3.1**

En todos los casos la concentración final fue ajustada a  $10^6$  células/ ml para su posterior utilización en el cocultivo.

#### 5.3.1.2 Ajuste de la concentración *H. pylori* para el cocultivo:

Todas las UFC de *H. pylori* de cada pase de agar sangre (tras 24 horas de incubación en la atmosfera adecuada) se resuspendieron en 1 ml de RPMI para su posterior lectura espectrofotométrica.

Considerándose que una densidad óptica (DO) de 1 corresponde a una concentración de  $10^9$  *H. pylori*/ml<sup>100</sup> y que la concentración necesaria para el cultivo era de  $2 \times 10^8$  UFC/ml, se calcularon los  $\mu$ l de suspensión bacteriana y RPMI necesarios.

## RESULTADOS

### 5.3.1.3 Interleucina-12 producida tras el cocultivo:

Se analizaron un total de 38 muestras en 3 ensayos distintos. En todos los casos el sobrenadante fue diluido 1/10 antes de realizar la detección por ELISA. Para cada uno de estos ensayos se calculó la recta de calibrado correspondiente con una longitud de onda de 450nm (tabla 5.3.2):

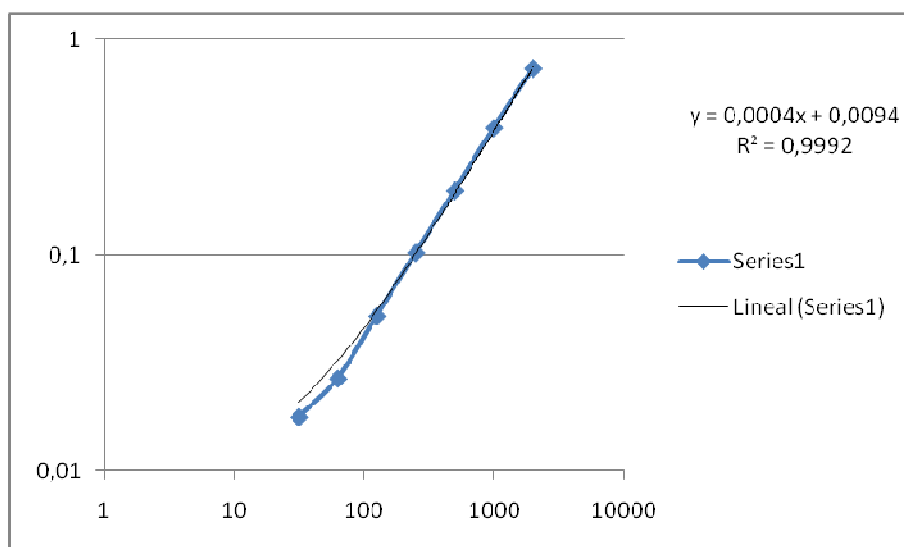
Estándar (eje X)	Absorbancia (eje Y)
2000 pg/ml	0,74
1000 pg/ml	0,39
500 pg/ml	0,20
250 pg/ml	0,10
125 pg/ml	0,05
62,5 pg/ml	0,027
31,25pg/ml	0,018

**Tabla 5.3.2**

Lo que permitió calcular la recta de calibrado correspondiente (Figura 5.3.1):



## RESULTADOS



**Figura 5.3.1**

A partir de la cual se obtuvieron las concentraciones de IL-12 medidas para cada aislamiento tras el cocultivo (Tabla 5.3.3):

N° Aislamiento	Absorbancia	Concentración 10X pg/ml	Concentración 1X pg/ml
2	0,277	667,75	6677,5
4	0,456	1116,5	11165
6	0,702	1732,33	17323,3
8	0,425	1039,83	10398,3
9	0,333	809,83	8098,3
10	0,453	1108,58	11085,8
11	0,627	1543,17	15431,7
29	0,585	1437,75	14377,5
53	0,584	1436,92	14369,2
7	0,908	1496,67	6006,67
30	1,098	1813,33	7273,33
33	1,174	1940	7780

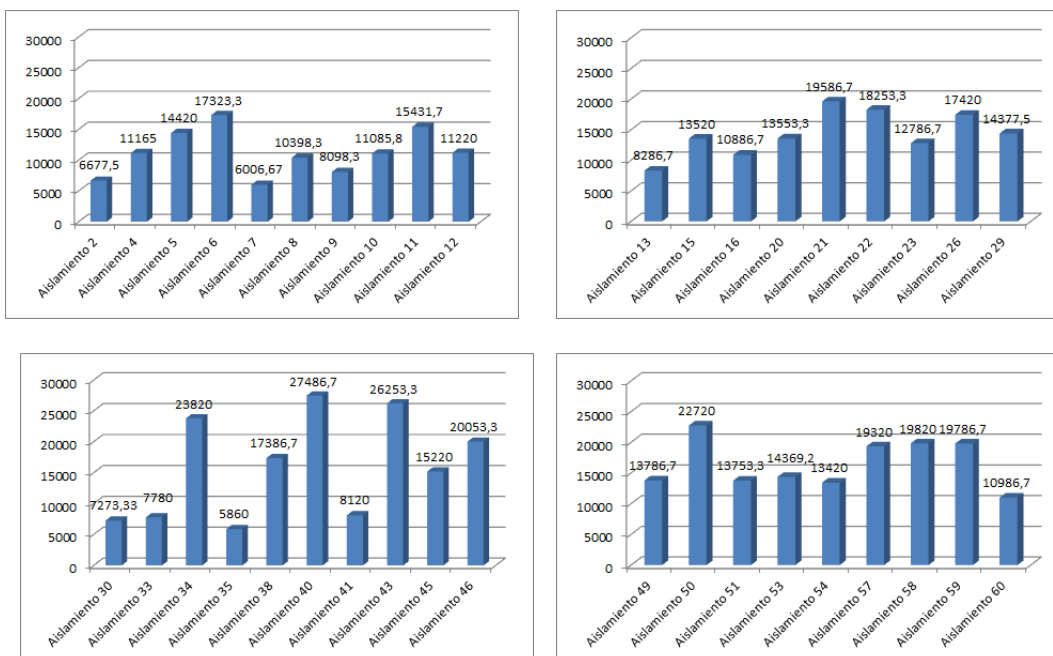
## RESULTADOS

N° Aislamiento	Absorbancia	Concentración 10X pg/ml	Concentración 1X pg/ml
35	0,886	1460	5860
5	0,427	1442	14420
12	0,331	1122	11220
13	0,243	828,67	8286,70
15	0,4	1352	13520
16	0,321	1088,67	10886,70
20	0,401	1355,33	13553,30
21	0,582	1958,67	19586,70
22	0,542	1825,33	18253,30
23	0,378	1278,67	12786,70
26	0,517	1742	17420
34	0,709	2382	23820
38	0,516	1738,67	17386,70
40	0,819	2748,67	27486,70
41	0,238	812	8120
43	0,782	2625,33	26253,30
45	0,451	1522	15220
46	0,596	2005,33	20053,30
49	0,408	1378,67	13786,70
50	0,676	2272	22720
51	0,407	1375,33	13753,30
54	0,397	1342	13420
57	0,574	1932	19320
58	0,589	1982	19820
59	0,588	1978,67	19786,70
60	0,324	1098,67	10986,70

**Tabla 5.3.3**

## RESULTADOS

En resumen, los niveles de IL-12 detectados en cada cepa se muestran en la figura 5.3.4:



**Figura 5.3.4**

Mientras que los niveles de IL-12 por rangos se detalla en la tabla 5.3.5:

Concentración de IL-12	Frecuencias
$5 \cdot 10^3$ pg/ml- $1 \cdot 10^4$ pg/ml	21,05%
$1 \cdot 10^4$ pg/ml- $1,5 \cdot 10^4$ pg/ml	36,84%
$1,5 \cdot 10^4$ pg/ml- $2 \cdot 10^4$ pg/ml	28,95%
$>2 \cdot 10^4$ pg/ml	13,16%

**Tabla 5.3.5**

Los resultados seguían una distribución normal según se comprobó (Tabla 5.3.6):

## RESULTADOS

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov

	IL-12 pg/ml
N	38
Media	14644,871
Desviación típica	5601,6735

La distribución de contraste es la Normal

**Tabla 5.3.6**

### 5. 3. 2) Influencia de los donantes en la producción de IL 12:

Para comprobar si la procedencia de las células mononucleares de sangre periférica afectaba a la producción de IL-12 en el cocultivo, se compararon las medias obtenidas con uno y otro donante (Tabla 5.3.7):

### IL-12 - Donante

		N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12	Donante A	22	14281,136	6417,3376
	Donante B	16	15145,006	4391,4623

**Tabla 5.3.7**

Prueba de Levene para igualdad de varianza	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,157	p= 0,625

**Tabla 5.3.8**

La t de student de la tabla 5.3.8 indica que el donante no influyó en la producción de IL-12.

## RESULTADOS

### 5. 3. 3) Influencia de las características propias del paciente en la producción de IL-12:

#### 5.3.3.1 Edad:

##### IL-12 - Edad

		N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12	Niños	18	13760,837	4259,4437
	Adultos	20	15440,502	6592,8874

Tabla 5.3.9

Prueba de Levene para igualdad de varianza	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,028	p= 0,363

Tabla 5.3.10

#### 5.3.3.2 Género:

##### IL-12 - Género

		N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12	Femenino	22	15476,140	5466,4435
	Masculino	16	13501,877	5758,3932

Tabla 5.3.11

Prueba de Levene para igualdad de varianza	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,953	p= 0,290

Tabla 5.3.12

## RESULTADOS

Las tablas 5.3.10 y 5.3.12 muestran las medias de niveles de IL-12 cuantificados según género y edad. Ninguno de estos factores influyó en la producción de IL-12, tal y como indican los resultados obtenidos en las tablas 5.3.9 y 5.3.11

### 5. 3. 4) Relación de la producción de IL-12 y los factores de virulencia:

#### 5.3.4.1 Gen *vacA*:

#### IL-12 – Gen *vacA* s

		N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12	<i>vacA</i> s1	14	13241,374	5731,9928
	<i>vacA</i> s2	24	15463,578	5478,1183

Tabla 5.3.13

Prueba de Levene para igualdad de varianzas	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,941	p= 0,243

Tabla 5.3.14

La presencia del gen *vacA* no se relacionó con la producción de IL-12, como indican los resultados obtenidos en las tablas 5.3.13 y 5.3.14.

#### 5.3.4.2 Gen *cagA*:

#### IL-12 – Gen *cagA*

		N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12	<i>cagA</i> positivo	13	12240,456	4516,5487
	<i>cagA</i> negativo	25	15895,167	5780,6658

Tabla 5.3.15

## RESULTADOS

Prueba de Levene para igualdad de varianza	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,344	p= 0,550

**Tabla 5.3.16**

La presencia del gen *cagA* no se relacionó con la producción de IL-12, como indican los resultados obtenidos en las tablas 5.3.15 y 5.3.16.

### 5.3.4.3 Gen *dupA*:

#### IL-12 – Gen *dupA*

	N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12 <i>dupA</i> positivo	16	13531,979	5138,9555
<i>dupA</i> negativo	22	15454,247	5898,5561

**Tabla 5.3.17**

Prueba de Levene para igualdad de varianza	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,328	p= 0,303

**Tabla 5.3.18**

La presencia del gen *dupA* no se relacionó con la producción de IL-12, como indican los resultados obtenidos en las tablas 5.3.17 y 5.3.18.

### 5.3.4.4 Gen *homB*:

#### IL-12 – Gen *homB*

	N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12 <i>homB</i> positivo	19	13947,147	5790,2203
<i>homB</i> negativo	19	15342,595	5472,3283

**Tabla 5.3.19**

## RESULTADOS

Prueba de Levene para igualdad de varianza	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,840	p= 0,450

**Tabla 5.3.20**

La presencia del gen *homB* no se relacionó con la producción de IL-12, como indican los resultados obtenidos en las tablas 5.3.19 y 5.3.20.

### 5.3.4.5 Gen *jhp0562*:

#### IL-12 – Gen *jhp0562*

	N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12 <i>jhp0562</i> positivo	19	13478,733	5853,3838
<i>jhp0563</i> negativo	19	15811,009	5231,4244

**Tabla 5.3.21**

Prueba de Levene para igualdad de varianza	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,592	p= 0,204

**Tabla 5.3.22**

La presencia del gen *jhp0562* no se relacionó con la producción de IL-12, como indican los resultados obtenidos en las tablas 5.3.21 y 5.3.22.

### 5. 3. 5) Relación de la producción de Il 12 con la clínica desarrollada:

#### IL-12 – Clínica desarrollada

	N	Media pg/ml	Desviación típica pg/ml
IL-12 Leve	25	15089,932	5723,2108
No Leve	13	13788,985	5480,3830

**Tabla 5.3.23**



## RESULTADOS

Prueba de Levene para igualdad de varianza	Prueba de t de student para igualdad de medias
p= 0,685	p= 0,505

**Tabla 5.3.24**

El desarrollo de un tipo u otro de clínica no se relacionó estadísticamente con la producción de IL-12, como se comprobó en las tablas 5.3.23 y 5.3.24

## 5.4 RESISTENCIA ANTIBIÓTICA:

### 5. 4. 1) Datos de sensibilidad antibiótica obtenidos para cada uno de los aislamientos:

N° Aislamiento	Amx	Tetr	Mzd	Cla	Fq	Rif
1	S	S	S	R	S	S
2	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	R	S	S
4	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
5	S	S	R	S	S	I
6	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	S	S
9	S	S	R	S	S	S
10	S	S	R	S	S	S
11	S	S	R	R	S	S
12	S	S	S	S	S	S
13	R	S	S	S	S	S
14	S	S	R	R	S	S
15	S	S	S	R	S	S
16	S	S	R	S	S	S
17	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
18	S	S	S	S	S	S
19	S	S	S	R	S	S
20	S	S	R	S	S	S
21	S	S	R	S	S	S
22	S	S	R	R	S	S
23	S	S	S	S	S	I
24	S	S	R	S	S	S
25	S	S	R	R	S	S
26	S	S	R	S	S	S
27	S	S	R	R	S	S
28	S	S	R	S	S	S
29	S	S	S	R	S	S
30	S	S	S	S	S	S
31	S	S	R	R	R	S
32	S	S	S	R	S	S
33	S	S	R	S	S	S
34	S	S	S	S	S	S
35	S	R	R	S	S	S
36	S	S	S	S	S	S
37	S	S	S	S	S	S
38	S	S	S	R	S	S
39	S	S	S	S	S	S
40	S	S	S	S	S	S

## RESULTADOS

N° Aislamiento	Amx	Tetr	Mzd	Cla	Fq	Rif
41	S	S	S	S	S	S
42	S	S	R	R	S	R
43	S	S	R	R	S	S
44	S	S	S	S	S	S
45	S	S	S	S	S	S
46	S	S	R	S	R	S
47	S	S	R	S	S	S
48	S	S	S	S	S	S
49	S	S	R	R	S	S
50	S	S	S	R	S	S
51	S	S	R	S	S	S
52	S	S	R	R	S	S
53	S	S	R	S	S	S
54	S	S	S	S	S	S
55	R	S	S	R	S	S
56	S	S	R	R	R	S
57	S	S	S	S	S	S
58	S	S	S	R	S	S
59	S	S	S	S	S	S
60	S	S	R	R	S	S
61	S	S	S	S	S	S
62	S	S	S	S	S	S
63	S	S	S	S	S	S
64	S	S	R	R	S	S
65	S	S	R	R	S	S
66	S	S	S	S	S	S
67	R	S	S	S	S	S
68	S	S	S	R	S	S
69	S	S	S	S	S	S
70	S	S	R	S	S	S
71	R	S	S	R	S	S
72	S	S	R	R	S	S
73	S	S	S	S	S	S
74	S	S	R	I	S	S
75	S	S	S	S	S	S
76	S	S	S	S	S	S
77	S	S	S	S	S	S
78	S	S	S	S	S	S
79	S	S	R	R	S	S
80	S	S	R	R	S	S

**Tabla 5.4.1**

(Amx: Amoxicilina, Tetr: Tetraciclinas, Mzd: Metronidazol, Cla: Claritromicina, Fq: Fluorquinolonas, Rif: Rifabutina, S: sensible, I: Intermedio, R: Resistente.)

## RESULTADOS

### 5. 4. 2) Análisis de la resistencia observada frente a antibióticos utilizados para el tratamiento de *Helicobacter pylori*:

No fue posible determinar la sensibilidad antibiótica en dos de los aislamientos. Para el resto, los porcentajes de sensibilidad frente a antibióticos utilizados en el tratamiento de la infección por *H. pylori* se recogen en las tablas 5.4.2 a 5.4.7.

#### Amoxicilina

	Frecuencia	Porcentaje
Resistente	4	5,13
Sensible	74	94,87
Total	78	100,0

Tabla 5.4.2

#### Tetraciclinas

	Frecuencia	Porcentaje
Resistente	1	1,28
Sensible	77	98,72
Total	78	100,0

Tabla 5.4.3

#### Metronidazol

	Frecuencia	Porcentaje
Resistente	38	43,59
Sensible	44	56,41
Total	78	100,0

Tabla 5.4.4

#### Claritromicina

	Frecuencia	Porcentaje
Resistente	29	37,18
Intermedio	1	1,280
Sensible	48	61,54
Total	78	100,0

Tabla 5.4.5

#### Fluorquinolonas

	Frecuencia	Porcentaje
Resistente	3	3,85
Sensible	75	96,15
Total	78	100,0

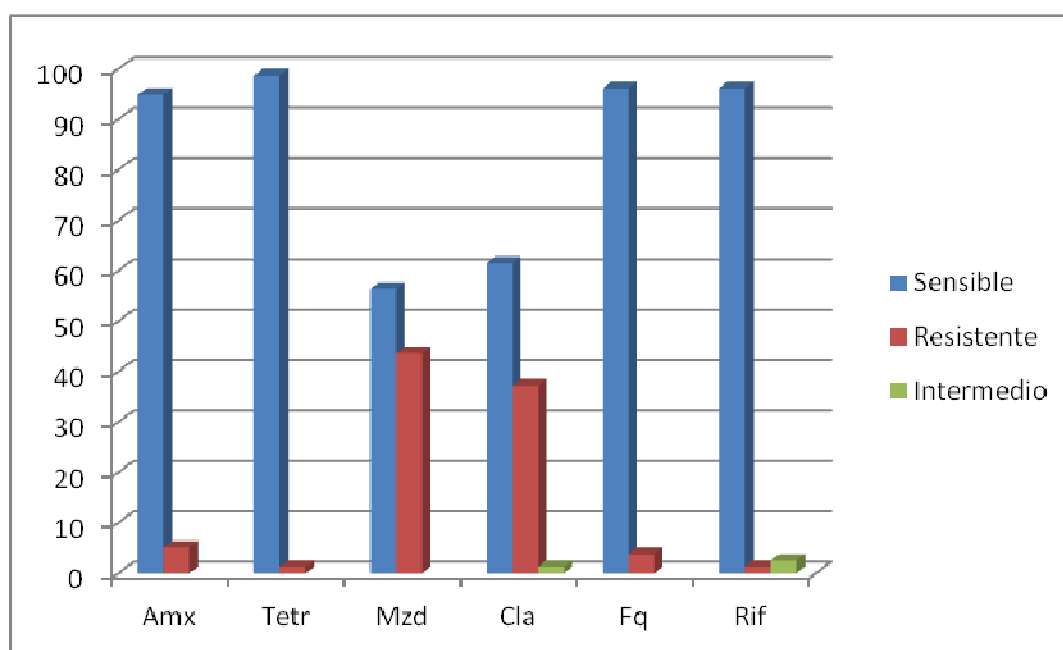
Tabla 5.4.6

#### Rifabutina

	Frecuencia	Porcentaje
Resistente	1	1,28
Intermedio	2	2,57
Sensible	75	96,15
Total	78	100,0

Tabla 5.4.7

## RESULTADOS



**Figura 5.4.1**

El conjunto de niveles de resistencia obtenidos frente a los 6 antibióticos estudiados se muestra en la figura 5.4.1

## RESULTADOS

### 5. 4. 3) Determinación genotípica de mutaciones de resistencia:

Se comparó el análisis de sensibilidad frente a claritromicina y fluorquinolonas por métodos fenotípicos (a partir de cepa) y genotípicos (directamente desde la biopsia) en 29 muestras. Los resultados se exponen en la tabla 5.4.8:

Nº Aislamiento	Cla Fenotipo	Cla Genotipo	Cla Mutaciones	Fq Fenotipo	Fq Genotipo	Fq Mutaciones
1	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
5	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
8	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
9	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
13	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
14	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
15	Resistente	Sensible	-	Sensible	Resistente	D91N-D91G
16	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
18	Sensible	S/R	A2143G	Sensible	Sensible	-
19	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
21	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
23	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
24	Sensible	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
26	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
27	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
29	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
32	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
35	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
36	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
37	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-

## RESULTADOS

Nº Aislamiento	Cla Fenotipo	Cla genotipo	Cla Mutaciones	Fq Fenotipo	Fq Genotipo	Fq Mutaciones
38	Resistente	S/R	A2143G	Sensible	Sensible	-
41	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
42	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
46	Sensible	Resistente	A2142C-A2143G	Resistente	Sensible	-
47	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-
50	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
51	Sensible	S/R	A2143G	Sensible	Sensible	-
58	Resistente	Resistente	A2143G	Sensible	Sensible	-
63	Sensible	Sensible	-	Sensible	Sensible	-

**Tabla 5.4.8**

Los porcentajes de sensibilidad/resistencia por cada método se recogen en la tabla 5.4.9:

	Fenotípico		Genotípico	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
<b>Claritromicina</b>	62,07%	37,93%	51,72%	48,28% <sup>(1)</sup>
<b>Fluorquinolonas</b>	96,55%	3,45%	96,55%	3,45%

<sup>(1)</sup> Incluidos tres aislamientos que portaban el gen 23S ribosomal tanto en su forma salvaje como en la mutada.

**Tabla 5.4.9**

Según se muestra en la tabla 5.4.7, para **claritromicina** se observaron 5 casos discrepantes (20,7%):

## RESULTADOS

- 1 cepa resistente por cultivo no presentaba mutaciones en el gen 23S (posiciones 2142 y 2143).
- 4 cepas sensibles en cultivo mostraron mutaciones en el gen 23S:
  - 2 de ellas presentaban mutaciones del gen 23S ribosomal en la posición 2143.
  - Las otras 2 fueron positivas tanto para el gen mutado como para la forma natural del mismo.

En base a estos resultados se calculó una sensibilidad para la detección de resistencia a claritromicina del 73,33% por el método fenotípico y del 93,33% por el genotípico.

Según se muestra en la tabla 5.4.7, para **fluorquinolonas**, se observaron dos aislamientos resistentes, uno detectado por el método fenotípico y otro por el genotípico.

En cuanto al tipo de mutaciones causantes de resistencia para cada antibiótico, como también se recoge en la tabla 5.4.7:

- Todas las cepas resistentes a claritromicina fueron positivas para la mutación A2143G. Una de ellas además lo fue para la mutación A2142C.
- El aislamiento resistente a fluorquinolonas fue positivo para la mutación que afecta al codón 91 del gen *gyrA*.



## RESULTADOS

### 5. 4. 4) Relación entre la resistencia, factores propios del paciente y la clínica desarrollada:

Los dos antibióticos que presentaron unas mayores tasas de resistencia fueron metronidazol y claritromicina. Fue en estos antibióticos donde se estudió la relación de dicha resistencia con la edad, sexo, gravedad clínica y los distintos factores de virulencia.

#### 5.4.4.1 Tasas de resistencia antibiótica según la edad de los pacientes:

##### Edad - Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
Edad	Adultos	17	19	36
	Niños	17	25	42
Total		34	44	78

(p= 0, 549 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.10

##### Edad - Claritromicina

		Claritromicina		Total
		I/R	S	
Edad	Adultos	10	26	36
	Niños	20	22	42
Total		30	48	78

(p= 0,073 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.11

La edad no fue un factor diferencial ni para claritromicina ni para metronidazol como se indica en las tablas 5.4.10 y 5.4.11

## RESULTADOS

### 5.4.4.2 Tasas de resistencia antibiótica según el sexo de los pacientes:

#### Género - Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
Género	Femenino	21	23	44
	Masculino	13	21	34
Total		34	44	78

(p= 0,402 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.12

#### Género - Claritromicina

		Clarithromicina		Total
		I/R	S	
Género	Femenino	16	28	44
	Masculino	14	20	34
Total		30	48	78

(p= 0,665 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.13

El sexo del paciente tampoco fue un factor diferencial ni para claritromicina ni para metronidazol como indican los resultados de las tablas 5.4.12 y 5.4.13

### 5.4.4.3 Tasas de resistencia antibiótica según la clínica desarrollada:

#### Gravedad Clínica

		Total
Gravedad Clínica	Moderada	3
	Leve	47
	Sin alteraciones	15
	Sin datos	13
Total		78

Tabla 5.4.14

## RESULTADOS

El grupo con mayor significancia estadística fue el de los pacientes cuyos hallazgos histológicos y endoscópicos fueron clasificados como leves (Tabla 5.4.14). Por este motivo se analizó si pertenecer a este grupo tenía algún tipo de influencia en la resistencia detectada frente a metronidazol y/o claritromicina de la cepa colonizante.

### Gravedad Clínica - Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
Gravedad Clínica	Leve	22	25	47
	No Leve	5	13	18
Total		27	38	65

(p= 0,164 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.4.15**

### Gravedad Clínica - Claritromicina

		Claritromicina		Total
		I/R	S	
Gravedad Clínica	Leve	17	30	47
	No Leve	6	12	18
Total		23	42	65

(p= 0,831 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.4.16**

Presentar hallazgos clasificados como leves no fue un factor diferencial ni para claritromicina ni para metronidazol como se indica en las tablas 5.4.15 y 5.4.16.

## RESULTADOS

### 5.4.4.4 Tasas de resistencia antibiótica según el origen del paciente:

Se excluyeron 5 pacientes para los que no se pudo determinar el origen y/o la resistencia antibiótica.

#### Origen – Resistencia Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
Origen	Extranjero	8	7	15
	España	24	36	60
Total		32	43	75

(p= 0,350 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.17

#### Origen – Resistencia Claritromicina

		Clarithromicina		Total
		I/R	S	
Origen	Extranjero	5	10	15
	España	23	37	60
Total		28	47	75

(p= 0,720 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.18

El origen no influyó en los niveles de resistencia obtenidos en la población estudiada, como se deduce de los resultados obtenidos en las tablas 5.4.17 y 5.4.18.

### 5.4.4.5 Tasas de resistencia antibiótica según tratamiento previo recibido:

Se excluyeron 6 pacientes para los que no se pudo determinar si habían recibido tratamiento previo y/o la resistencia antibiótica.

## RESULTADOS

### Tratamiento previo - Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
Tratamiento previo	No	22	34	56
	Sí	10	8	18
Total		32	46	74

(p= 0,221 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.4.19**

### Tratamiento previo - Claritromicina

		Clarithromicina		Total
		I/R	S	
Tratamiento previo	No	16	40	56
	Sí	12	6	18
Total		28	46	74

(p= 0, 004 mediante Chi cuadrado; OR= 0,200; CI al 95 % = 0,064-0,625)

**Tabla 5.4.20**

Los pacientes que no habían recibido tratamiento previo presentaron un riesgo menor de desarrollar resistencias frente claritromicina (tabla 5.4.20), pero no frente a metronidazol (Tabla 5.4.19).

#### **5. 4. 5) Relación entre la resistencia y los factores de virulencia analizados:**

En dos casos, no fue posible determinar la sensibilidad antibiótica. Se analizó la relación entre la presencia de cada gen y el resto de pacientes de los que sí se conocía la sensibilidad frente a metronidazol y claritromicina.

## RESULTADOS

### 5.4.5.1 Gen *vacA*:

#### *vacA s* - Metronidazol

	Metronidazol		Total
	R	S	
<i>vacA s</i> s 1	10	11	21
s 2	24	33	57
Total	34	44	78

(p= 0,663 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.21

#### *vacA s* – Claritromicina

	Claritromicina		Total
	I/R	S	
<i>vacA s</i> s 1	4	17	21
s 2	26	31	57
Total	30	48	78

(p= 0,032 mediante Chi cuadrado; OR= 0,281; CI al 95%= 0,084-0,938)

Tabla 5.4.22

El perfil alélico del gen *vacA s*, no se relacionó con la sensibilidad frente a metronidazol (tabla 5.4.21) pero sí a claritromicina (tabla 5.4.22): Los aislamientos *vacA s1* presentaron un riesgo significativamente menor de ser resistentes.

## RESULTADOS

### 5.4.5.2 Gen *cagA*:

#### *cagA* - Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
<i>CagA</i>	Negativo	24	33	57
	Positivo	10	11	21
Total		34	44	78

(p= 0,663 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.23

#### *cagA* - Claritromicina

		Claritromicina		Total
		I/R	S	
<i>cagA</i>	Negativo	27	30	57
	Positivo	3	18	21
Total		23	55	78

(p= 0,008 mediante Chi cuadrado; OR= 5,400; CI al 95%= 1,431-20,382)

Tabla 5.4.24

La presencia o ausencia del gen *cagA*, no se relacionó con la sensibilidad frente a metronidazol (tabla 5.4.23) pero sí frente a claritromicina (tabla 5.4.24): Los aislamientos *cagA* positivos presentaron un riesgo significativamente menor de ser resistentes.

## RESULTADOS

### 5.4.5.3 Gen *dupA*:

#### *dupA* - Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
<i>dupA</i>	Negativo	23	29	52
	Positivo	11	15	26
Total		34	44	78

(p= 0,872 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.25

#### *dupA* - Claritromicina

		Clarithromicina		Total
		I/R	S	
<i>dupA</i>	Negativo	22	30	52
	Positivo	8	18	26
Total		30	48	78

(p= 0,323 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.26

El gen *dupA*, no se relacionó con la sensibilidad frente a metronidazol ni a claritromicina según los resultados indicados en las tablas 5.4.25 y 5.4.26.

### 5.4.5.4 Gen *homB*:

#### Gen *homB* – Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
<i>Hom</i>	B0	16	17	33
	No B	18	27	45
Total		34	44	78

(p= 0,455 mediante Chi cuadrado)

Tabla 5.4.27



## RESULTADOS

### Gen *homB* – Claritromicina

		Claritromicina		Total
		I/R	S	
<i>Hom</i>	B	14	20	33
	No B	16	29	45
Total		30	48	78

(p= 0,538 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.4.28**

Las tablas 5.4.27 y 5.4.28 indican que la presencia o ausencia del gen *homB*, no se relacionó con la sensibilidad frente a Metronidazol ni a claritromicina.

#### 5.4.5.5 Gen *jhp0562*:

### Gen *jhp0562* - Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
<i>jhp0562</i>	Negativo	15	21	36
	Positivo	19	23	42
Total		34	44	78

(p= 0,751 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.4.29**

### Gen *jhp0562* - Claritromicina

		Claritromicina		Total
		I/R	S	
<i>jhp0562</i>	Negativo	15	21	36
	Positivo	15	27	42
Total		30	48	78

(p= 0,590 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.4.30**

## RESULTADOS

Por último, según se indican los resultados de las tablas 5.4.29 y 5.4.30, el gen *jhp0562* no se relacionó con la sensibilidad frente a metronidazol ni a claritromicina.

### 5.4.5.6 Número de factores de virulencia positivos:

#### Nº Factores de Virulencia- Metronidazol

		Metronidazol			Total
		R	S	Sin Datos	
Nº Factores	Ninguno	3	10	0	13
	1Factor	16	14	0	30
	2Factores	3	6	2	11
	3Factores	5	8	0	13
	4Factores	6	3	0	9
	5Factores	1	3	0	4
Total		34	44	2	80

**Tabla 5.4.31**

Un 68,18% de los aislamientos sensibles (30 de 44 cepas) presentó 2 o menos factores de virulencia (Tabla 5.4.31). Sin embargo, este hecho no fue estadísticamente significativo como se expone en la tabla 5.4.32:

#### Factores de Virulencia- Metronidazol

		Metronidazol		Total
		R	S	
Nº Factores	2 o menos F. de virulencia	22	30	52
	Más de 2 F. de virulencia	12	14	26
Total		34	44	78

(p= 0,747 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.4.32**

## RESULTADOS

### Nº Factores de Virulencia- Claritromicina

		Claritromicina			Total
		I/R	S	Sin Datos	
Nº Factores	Ninguno	5	8	0	13
	1Factor	15	15	0	30
	2Factores	3	6	2	11
	3Factores	5	8	0	13
	4Factores	2	7	0	9
	5Factores	0	4	0	4
Total		30	48	2	80

**Tabla 5.4.33**

Un 60,42% de los aislamientos sensibles (29 de 48 cepas) presentaron 2 o menos factores de virulencia (Tabla 5.4.33). Sin embargo este hecho tampoco fue estadísticamente significativo según los resultados mostrados en la tabla 5.4.34:

### Factores de Virulencia- Claritromicina

		Claritromicina		Total
		I/R	S	
Nº Factores	2 o menos F. de virulencia	23	29	52
	Más de 2 F. de virulencia	7	19	26
Total		30	48	78

(p= 0,139 mediante Chi cuadrado)

**Tabla 5.4.34**

## **6. DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

La colonización por *Helicobacter pylori* se produce en alrededor de un 50% de la población mundial. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de los individuos colonizados desarrollará alteraciones que afecten significativamente a su salud. Estas alteraciones pueden ir desde una gastritis crónica superficial, hasta un cáncer de estómago o linfoma tipo MALT, pasando por las úlceras gástricas y duodenales<sup>200</sup>. Es por ello, que dos de los principales objetivos relacionados con este microorganismo serán, por un lado, conocer qué factores determinan la progresión desde la simple colonización hacia un estado patológico más o menos grave, y por otro, saber cuáles son las posibilidades terapéuticas para evitar dicha progresión y qué mecanismos utiliza la bacteria para evadirlos.

Los patrones de sensibilidad y mecanismos de resistencia serán abordados en el apartado 4 de esta discusión.

Los factores que influyen en el desarrollo de manifestaciones clínicas se agrupan en tres categorías principales:

- **Los factores ambientales y hábitos de vida:** aunque ya se ha demostrado que no son la única causa de patologías como la úlcera péptica, en presencia del *H. pylori* si pueden actuar como desencadenante o factor concomitante para el desarrollo de alteraciones más o menos graves<sup>201</sup>.
- **Los factores propios del individuo:** predisposición genética, intensidad de respuesta del sistema inmune tras la colonización (incluida la producción de interleucinas que se discutirá en el apartado 3 de esta discusión), etc
- **Los factores propios del microorganismo colonizante:** factores de virulencia sobre los que se tratará a continuación.

## **6.1 Prevalencia y distribución de distintos factores de virulencia en aislamientos de *H. pylori*:**

### **6. 1. 1) Gen *vacA*:**

Este gen se encuentra presente en todos los aislamientos de *H. pylori*<sup>43</sup> y, aunque en casi todos los casos da lugar a la proteína VacA<sup>42</sup>, menos del 50% expresa la citotoxina en su forma más activa. La diferente toxicidad de esta proteína se asocia con el hecho de que el gen *vacA* posee una estructura mosaico que le permite varias formas de presentación determinadas, principalmente, por la secuencia que codifican la región N-terminal de la proteína (región *s*) y la secuencia que codifica parte de la subunidad de unión a células epiteliales p55 (región *m*)<sup>30,63</sup>.

Confirmando este hecho, en el presente estudio todas las cepas resultaron positivas para el análisis de este gen pero se observaron distintos polimorfismos: *s1* o *s2* y *m1*, *m2* o *m1m2* simultáneamente. La presentación *s2* fue observada de forma excluyente frente a *s1* en casi tres cuartas partes de la población estudiada. Este tipo, *vacA s2*, ha sido relacionado habitualmente con un menor riesgo de desarrollo de úlcera péptica en países occidentales<sup>30,31,34,64,66,67,68</sup>. El mecanismo a través del cual esto se produce no ha sido, de momento, suficientemente esclarecido. Algunas teorías sugieren que *s1* sea más frecuente en cepas que además poseen otros factores de virulencia como la isla de patogenicidad PAI o la adhesina *BabA2*<sup>30,31,203</sup>, otras hipótesis sugieren que las cepas *s1* sean capaces de transcribir mayor cantidad de proteína y translocarla a través de la membrana<sup>204</sup> e incluso algunos autores proponen que el tipo *vacA s2* sea capaz de disminuir la capacidad de la proteína para formar canales en la membrana celular<sup>71</sup>.

La región *m*, más implicada en la interacción con las células gástricas que con la acción tóxica propiamente dicha<sup>73</sup>, también fue caracterizada durante el estudio. Así, la forma

## DISCUSIÓN

*m2*, asociada de igual forma que *s2* con perfiles menos virulentos del microorganismo, fue la más prevalente. Sin embargo, en esta ocasión no siempre se observó de forma excluyente: dos aislamientos fueron positivos para *m1* y *m2* al mismo tiempo. Este hecho ya había sido descrito en algunas poblaciones como por ejemplo en Taiwan<sup>42</sup>, para las que además se ha encontrado una capacidad de vacuolización que parece similar a las cepas *m1*<sup>44</sup>.

Todas las combinaciones entre ambas regiones son posibles. En nuestro estudio, confirmando la tendencia ya descrita en España años atrás<sup>215</sup>, la combinación más frecuente fue sin duda *s2m2*. Asimismo, destacó la capacidad de la secuencia *s2* para actuar como predictor de la secuencia *m2*. No ocurrió lo mismo con los tipos *vacA s1* y *m1*, a diferencia de lo descrito en otros estudios<sup>205</sup>.

Analizando los dos genotipos más prevalentes (*s1m1* y *s2m2*) se observó una relación estadísticamente significativa con la edad de los pacientes: los niños estaban colonizados principalmente por cepas asociadas a una menor virulencia (*s2m2*) y en menor medida por cepas más virulentas (*s1m1*). Este hecho podría estar relacionado con la baja incidencia de úlcera péptica en población pediátrica general<sup>253</sup>, si bien es cierto que el presente estudio no incluyó pacientes con dicha patología ni en niños ni en adultos.

En este estudio, la presencia de uno u otro genotipo no se relacionó, ni con el género ni el desarrollo de patología más o menos grave.

### **6. 1. 2) Gen *cagA*:**

El gen que codifica la proteína antigénica CagA, no está presente en su forma completa en todas las cepas de *H. pylori*, lo que permite dividir este microorganismo en dos subpoblaciones diferenciadas en función de la producción o no de la proteína. La ausencia del gen *cagA* se relaciona con un menor riesgo de manifestaciones gástricas

## DISCUSIÓN

graves. Sin embargo, la incidencia entre las *CagA* positivas no es uniforme debido, al menos en parte, a la estructura polimórfica de esta proteína: según el número y tipo de “EPIYA motifs” el riesgo de desarrollar patología grave será mayor o menor. En las cepas de origen occidental, encontramos habitualmente una copia de EPIYA- A, otra de B y al menos una de C. Un mayor número de repeticiones de esta última se relaciona con un mayor riesgo de cáncer gástrico<sup>206</sup>. Sin embargo, en las cepas de origen asiático esta secuencia suele estar sustituida por la denominada EPIYA- D, que parece tener una mayor unión con la proteína quinasa, permitiéndole producir mayores niveles de inflamación, gastritis y atrofia<sup>39,84,92</sup>.

Por otra parte, la prevalencia de cepas *cagA*+ también parece seguir un patrón geográfico de forma que alrededor de un 60% de las cepas de origen occidental (Europa y América) son portadoras de este gen así como la práctica totalidad de las de origen oriental<sup>4,43,103</sup>. Estudios realizados en Europa muestran resultados diferentes en cuanto a la detección del gen *cagA*, así en países del Este como Eslovenia y Turquía la prevalencia es del 61.2 % y 73 % respectivamente, mientras que en países del Norte como Suecia e Islandia, la prevalencia es mucho menor: 11 % y 36 % respectivamente<sup>207,208,209</sup>.

En la población analizada en este trabajo, casi un 75% de los aislamientos resultaron *cagA* negativos, una cifra superior a la descrita en estudios previos realizados en población española en 2006<sup>210</sup>, 2008<sup>272</sup> y 2010<sup>211</sup>, con porcentajes de 48,3%, 27,8% y 37,6% respectivamente. El estudio de 2008, que presentó los mayores niveles de cepas *cagA* positivas, fue realizado en España pero incluía pacientes inmigrantes en su mayoría. En el presente estudio el 77,5% de los pacientes eran autóctonos y sólo el 22,5% extranjeros. Aún así, el riesgo de estar colonizado por cepas portadoras del gen fue significativamente mayor en pacientes nacidos fuera de España.



## DISCUSIÓN

No se encontró que la presencia o ausencia del gen *cagA* siguiera ningún patrón relacionado con la edad o género de los pacientes incluidos en el estudio.

Desde un punto de vista patológico, las cepas *cagA* positivas se relacionan, al menos en países con una prevalencia moderada<sup>212</sup>, con el desarrollo de una sintomatología más grave en forma de gastritis severa, atrofia de la mucosa o alto riesgo de úlcera o cáncer gástrico<sup>27,68,96</sup>. Se ha propuesto como hipótesis que explique esto, que las cepas *cagA* + sean más sensibles a la acidez, de forma que para librarse de ella deben colonizar la zona más cercana al epitelio donde el pH es alrededor de 7, aumentando de esta forma la interacción con las células del huésped y produciendo así una mayor respuesta inflamatoria<sup>213</sup>.

En la población estudiada, la presencia o ausencia de *cagA* no se asoció a una mayor o menor gravedad de las manifestaciones clínicas, si bien es cierto que dicha población no incluía pacientes con cáncer gástrico, gastritis atrófica o linfoma tipo MALT.

### **6. 1. 3) Relación genes *vacA* y *cagA*:**

Clásicamente, la combinación de ambos genes ha sido utilizada como una de las formas más precisas de describir el poder patógeno de un aislamiento de *H. pylori*<sup>179,214</sup>.

En el presente estudio se observó una clara asociación entre ambos genes siendo *s2m2-cagA* negativa la combinación alélica más frecuente, hecho también observado en aislamientos españoles en 2010<sup>211</sup>. Puesto que la literatura publicada al respecto<sup>179,215</sup> describe dos patrones distintos en función del riesgo de desarrollar una patología más o menos grave, se analizó si este hecho podía confirmarse en la población analizada. Así, se observó que presentar una combinación alélica *s2* y *cagA* negativa estaba estadísticamente relacionado con el hallazgo de alteraciones endoscópicas e histológicas de tipo leve: gastritis crónica superficial y/o nodularidad antral.

#### 6. 1. 4) Gen *dupA*:

En 2005, Hong Lu et al describieron dos nuevos genes presentes en la región plástica, *jhp0917* y *jhp0918*, ambos homólogos a genes VirB4.

El conjunto de ambos se ha denominado **Duodenal Ulcer Promoting gen (*dupA* gen)** debido a que en el momento de su descripción, Lu et al, observaron su presencia como un importante marcador para el desarrollo de úlcera duodenal y como protector frente al cáncer gástrico en pacientes de Japón, Corea y Colombia. Por primera vez se asoció un gen concreto con una patología determinada: la úlcera duodenal. Según sus resultados, la presencia de los genes *jhp0917* y *jhp0918* sería prevalente entre pacientes con úlcera duodenal (42%)<sup>34</sup>. Además, esta relación era constante tanto en cepas asiáticas como occidentales. Estudios posteriores han obtenido resultados discrepantes en función de la zona geográfica<sup>4,98</sup>, de la edad<sup>96</sup> y, recientemente, también de la secuencia del propio gen.

Por este motivo, en el presente trabajo se diseñaron unos primers específicos para su detección en la población a estudio que, como ya se señaló, incluye una mayoría de pacientes de origen español.

La prevalencia obtenida fue de un 35%, cifra similar a la encontrada en India<sup>4</sup>, China<sup>216</sup>, Irán, Irak<sup>217</sup> y distintos países de Europa<sup>98</sup>.

En el presente estudio, entre los pacientes adultos el porcentaje de aislamientos *dupA* positivos fue del 45,95%, mientras que en la población pediátrica este porcentaje fue del 25,58%. A pesar de esta diferencia, el análisis estadístico de la relación presencia del gen/edad no resultó significativa. Además estos resultados discrepan con los obtenidos en Brasil por Gomes et al<sup>96</sup>, en cuyo estudio el gen *dupA* fue más frecuente en niños que en adultos por lo que especularon que la infección se adquiriese en la infancia y luego el

## DISCUSIÓN

gen pudiera perderse en infecciones a largo plazo cuando la mucosa gástrica empieza a atrofiarse.

Durante el presente estudio no se encontró una asociación clara con la mayor o menor gravedad de los hallazgos endoscópicos y/o histológicos. Si bien es cierto que el número de pacientes con lesiones ulcerosas en la población analizada no fue suficiente para constituir un grupo con significancia estadística, lo cierto es que desde la descripción de este gen, su implicación, distribución y forma de detección han sido motivo de gran controversia a lo largo de los últimos años:

- En 2007 Argent et al, examina cepas procedentes de Bélgica, Sudáfrica, China y Estados Unidos, sin encontrar ninguna relación entre el gen y la clínica. Es probable que esto se deba a que la prevalencia de estas enfermedades en las poblaciones analizadas es demasiado baja para conocer el efecto real. Sin embargo, Argent si describe diferentes prevalencias del gen en las distintas zonas geográficas<sup>98</sup>. En cambio, ese mismo año otro estudio realizado en la India describe de nuevo una mayor prevalencia del gen *dupA* en pacientes con úlcera, si bien este estudio no incluye pacientes con cáncer<sup>4</sup>.
- En 2008, el análisis de cepas iraníes realizado por Douraghi et al, parece indicar que la presencia del gen es independiente del desarrollo de la clínica aunque sí que resulta menos frecuente en pacientes con lesiones precancerosas o folículos linfoides<sup>218</sup>. Paralelamente, Hussein et al comparan características de cepas iraquíes e iraníes y no encuentran relación entre la presencia del gen *dupA* y las distintas presentaciones clínicas para la población iraní, pero sí una importante asociación de este gen con la úlcera duodenal<sup>217</sup>.

En Brasil los resultados tampoco parecen relacionar el gen con una patología concreta pero sí parece más frecuente en niños que en adultos por lo que

## DISCUSIÓN

especulan que la infección se adquiriera en la infancia y luego el gen pueda perderse en infecciones a largo plazo cuando la mucosa gástrica empieza a atrofiarse<sup>96</sup>. Mientras que en China Zhiyu Zhang describe de nuevo una situación que apoya la hipótesis inicial: mayor prevalencia del gen en pacientes con úlcera duodenal y protección frente al cáncer gástrico<sup>216</sup>.

- En 2009 se publica un único estudio que incluye pacientes suecos, australianos, chinos, indios y malayos. La prevalencia del gen *dupA* varía mucho de unos orígenes a otros y no se observa relación con el desarrollo clínico<sup>219</sup>.
- En 2010, los metaanálisis realizados por Seiji Shiota<sup>220</sup> y Hussein<sup>221</sup>, concluyen que la presencia del gen influye en el riesgo de padecer úlcera duodenal, principalmente en los países asiáticos.
- En la segunda mitad del año 2010 y durante 2011 aparecen los primeros estudios que sugieren la importancia del polimorfismo del gen: Hussein et al<sup>100</sup> y el grupo de Dulciene Queiroz<sup>99,222</sup> describen distintos polimorfos del gen y la posibilidad de que el descrito como gen *dupA1* sea la forma implicada en el riesgo de padecer úlcera duodenal.
- El artículo más reciente (octubre 2011) expone la posibilidad de que el gen *dupA* forme parte de un sistema de secreción tipo 4 (SST4) y que sólo la presencia de este sistema intacto influya en la clínica producida por el aislamiento.

Todo lo anterior demuestra que serán necesarios futuros estudios ya que, probablemente, de momento no sea suficiente una PCR para detectar el gen (lo más fiable sería utilizar inmunoblotting para detectar la proteína DupA intacta y estudiar el gen de estas cepas). Estudios sobre la proteína DupA y los genes adyacentes que pudieran estar formando parte de un nuevo SST4 están de momento en los primeros pasos de investigación y constituyen un claro objetivo para el futuro.

### 6. 1. 5) Gen *homB*:

Este gen (también conocido como *jhp870*) codifica una proteína de membrana de *H. pylori*<sup>109</sup>. La presencia de este gen se relaciona con la respuesta inflamatoria (incrementando la secreción de IL-8 por parte de las células epiteliales gástricas), la capacidad de adherencia de la bacteria a la mucosa gástrica y el desarrollo de úlcera péptica. Presenta un 90% de similitud con el gen *homA*, que a diferencia de *homB*, se relaciona con casos de gastritis sin desarrollo de úlcera duodenal<sup>223</sup>. En la población caracterizada se encontró que la prevalencia de estos genes estaba en torno al 50% para *homA* y al 40% para *homB*, porcentajes algo inferiores a los encontrados en 2009 por Sung Woo Jung, que observó alrededor de un 60% de ambos<sup>109</sup>. En una misma cepa pueden encontrarse presentes ambos genes o uno sólo de ellos (lo que resulta más frecuente) y cada uno puede presentar una o más copias: la presencia de dos copias de *homB* aumenta el riesgo de desarrollar úlcera, mientras que una única copia de *homA* lo disminuye<sup>108</sup>. En el presente estudio, la presencia de cada uno de ellos resultó excluyente para el otro, hallándose asimismo 4 aislamientos que fueron negativos para ambos tras PCR, hecho poco corriente pero previamente descrito<sup>224</sup> y que indicaría que su expresión no es indispensable para la correcta adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica. Este gen se ha relacionado en algunos estudios con el desarrollo de úlcera péptica<sup>107</sup>, mientras que en otros se describe como marcador de cáncer gástrico<sup>109</sup>. Sin embargo, en el presente estudio se observó su presencia en un número importante de cepas que procedían de pacientes sin hallazgos ulcerosos, hecho que también ha sido descrito previamente<sup>108</sup>.

La distribución de ambos genes no se asoció con el género de los pacientes a los que colonizaban, ni tampoco con la edad a pesar de que un 60% de la población pediátrica portaba el gen *homB*, frente a un 43,24% de la población adulta.

### **6. 1. 6) Gen *jhp0562*:**

Este gen codifica una glicosiltransferasa implicada en la síntesis del lipopolisacárido. Presenta un 80% de similitud con el gen *jhp0563*, encargado de codificar una  $\beta$ -1,3-galactosidasa implicada en la síntesis de Lewis de tipo I del LPS.

En la población estudiada, la mayor parte de los aislamientos presentaron el gen *jhp0563* (45%) o ambos (37,5%). El gen *jhp0562* estaba presente en más de la mitad de los aislamientos (53,75%) pero de forma exclusiva sólo alrededor del 16%. En una única cepa no se detectó ninguno de los dos genes.

De momento existen pocos estudios sobre el mismo, pero su presencia o ausencia parece ser relevante en pacientes pediátricos<sup>114</sup>. Sin embargo, en el presente estudio no se encontró diferencia en la distribución del gen según la edad del paciente. Sí fue significativa la presencia de este gen en pacientes nacidos fuera de España.

En cuanto a la clínica, según la presencia o no de estos dos genes se han descrito cuatro posibles patrones<sup>115</sup>:

- Una única copia de *jhp0562*: se relaciona con mayor riesgo de úlcera.
- Una única copia de *jhp0563*: se relaciona con gastritis sin desarrollo de úlcera.
- Una copia de cada gen: también aumenta el riesgo de padecer úlcera.
- Dos copias de distintos tamaños del gen *jhp0563*: bajo riesgo de sufrir úlcera.

De las 80 cepas analizadas un 62,5% portaban el gen *jhp0563* sólo o junto a una copia del gen *jhp0562* y la mayoría, a diferencia de lo descrito previamente, presentaban hallazgos endoscópicos e histológicos leves o incluso sin alteraciones.

No se observaron diferencias de distribución en función del sexo de los pacientes, pero sí una fuerte asociación de este nuevo gen con los factores de virulencia clásicos.

## 6.2 Interrelación de los factores de virulencia

### analizados:

Microbiológicamente, como ya se ha descrito con anterioridad, la presencia de determinados genes de virulencia aumenta las posibilidades de padecer distintas patologías. Por ejemplo, la isla de patogenicidad *cagA* parece ser especialmente importante en el caso del cáncer gástrico, aumentando el riesgo en presencia de cepas de *H. pylori* que la contienen frente a cepas en las que se encuentra ausente<sup>270</sup>. Lo mismo ocurre con la presentación *slm1* del gen *vacA*<sup>76</sup> y probablemente también con la región intermedia *i1*<sup>5</sup>. En cuanto al gen *dupA*, los primeros estudios describieron una posible protección frente a esta patología ya que su presencia se relacionaba con el desarrollo de la úlcera duodenal. Sin embargo, posteriores estudios cuestionan dicha relación. A su vez, la detección de los genes *homB* y *jhp0562* se ha asociado a mayores tasas de úlcera especialmente en población pediátrica<sup>225</sup>. Por todo ello resultó especialmente relevante analizar la presencia de distintos factores en conjunto y su influencia en las alteraciones sufridas por los pacientes.

La caracterización molecular de los 80 aislamientos incluidos en el estudio se realizó en base a los resultados obtenidos para un total de 5 factores de virulencia: *vacA*, *cagA*, *dupA*, *homB* y *jhp0562*.

De ellos los más prevalentes fueron *jhp0562* (más del 50%) y *homB* (42,5%), seguidos por *dupA* (35%) y *sl* y *cagA* (26,25% en ambos casos).

Un 16,25% de los aislamientos fueron negativos para todos los genes buscados. De entre los que resultaron positivos para uno o más de ellos, la mayoría presentaban un único factor (37,5%) y sólo 4 aislamientos (5%) portaban los 5 genes estudiados.

## DISCUSIÓN

Cuando un único factor era detectado, en más de un 35% de los casos el gen positivo era *jhp0562*. Si eran dos los factores observados, la combinación *dupA-homB* era la predominante (45,45%), mientras que *s1-cagA-jhp0562* se observó en un 38,47% de los aislamientos con 3 genes presentes en su ADN. Entre los aislamientos con cuatro de los cinco genes presentes, más del 50% resultaron positivos para todos los genes excepto el gen *dupA*.

Finalmente se evaluó cómo se asociaban los 5 factores de virulencia en el conjunto de la población estudiada, observándose que los factores más intensamente relacionados fueron *vacAs1*, *cagA* y *jhp0562*.

La presencia o ausencia de las distintas combinaciones genotípicas influye, según han reflejado diversos estudios, en la clínica desarrollada por los pacientes. En el presente estudio un 70,83% de los pacientes con clínica leve fueron positivos para 2 ó menos factores de virulencia, aunque esta relación no resultó estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando se analizó la asociación entre el número de factores de virulencia presentes en cada aislamiento y el origen de los pacientes se observó que los pacientes nacidos fuera de España presentaban un mayor riesgo de estar colonizados por cepas portadoras de más de 2 factores de virulencia.

### **6.3 Cuantificación de la producción de IL-12 tras cocultivo y su relación con los factores de virulencia analizados:**

Tras la colonización, comienza una fase de infiltración masiva de polimorfonucleares y células monocíticas acompañada por un marcado aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias<sup>151</sup>. Puesto que *H. pylori* habita en la capa de mucus gástrico y normalmente no atraviesa la barrera celular, el contacto con células fagocíticas es



## DISCUSIÓN

limitado y más probable cuando se produce alguna alteración o daño en la mucosa. Sin embargo la interacción entre el microorganismo y las células T intraepiteliales puede darse sin ningún tipo de alteración en dicha barrera. Esta interacción se produce gracias a que los receptores Toll-like (TLR) de las células epiteliales gástricas, así como el Nod1 receptor, reconocen determinados componentes bacterianos iniciando la respuesta inmune con liberación de citoquinas proinflamatorias desde macrófagos, células dendríticas, mastocitos, células gástricas, etc<sup>226</sup>. Resulta relevante destacar que las interacciones de *H. pylori* con las células epiteliales gástricas dependen, entre otros factores, de las características propias de cada cepa. Así, presentar determinadas adhesinas favorece la unión de la bacteria a la mucosa<sup>227</sup>, mientras que la presencia de la isla de patogenicidad *cagA*<sup>228,229,230,231</sup> junto con la expresión de la forma activa de la proteína VacA, aumentan la permeabilidad de la capa epitelial gástrica<sup>232,233</sup> permitiendo que los antígenos de *H. pylori* puedan llegar a la lámina propia e iniciar la respuesta inflamatoria propiamente dicha<sup>234</sup>.

Estudios *in vitro* con células epiteliales gástricas describen una mayor producción de IL-8 en cepas *cagA* positivas respecto a aquellas que no lo eran<sup>33,273</sup>. Este hecho no parece repetirse siempre para el caso de *dupA*<sup>219</sup>. Sin embargo, sí que parecen detectarse altos niveles de IL-8 en la mucosa gástrica colonizada por aislamientos de *H. pylori dupA* positivos. Por este motivo, Hussein et al<sup>100</sup> proponen la posibilidad de que la liberación de IL-8 se deba a un estímulo indirecto por parte de otras citoquinas como la IL-12 liberada por los leucocitos mononucleares que acuden en la fase de infiltración masiva que tiene lugar al comienzo de la infección. En el presente estudio, se utilizaron células mononucleares obtenidas de sangre periférica. Los niveles de IL-12 obtenidos tras el cocultivo de los aislamientos a estudio con estas células, abarcaron un rango de entre  $5.10^3$  pg/ml y valores superiores a  $2.10^4$  pg/ml. Sin embargo, no se observó ningún

## DISCUSIÓN

grado de asociación con la presencia del gen *dupA*, así como con ninguno de los otros 4 factores de virulencia analizados. Una posible causa podría ser el hecho recientemente descrito de que el gen *dupA* parece ser un gen polimórfico. Quizá unas formas y no otras sean las que estén implicadas en la liberación de IL-12 e, indirectamente, de IL-8. Los niveles de IL-12 detectados tampoco se relacionaron con la edad o género de los pacientes a los que colonizaban.

La bibliografía revisada indica que se han publicado pocos trabajos que evalúen el papel de distintos microorganismos como estímulo en la producción de IL-12 por parte de estas células. Sin embargo, algunos estudios realizados con bacterias, como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*<sup>275</sup>, muestran un importante aumento de IL-12 tras la estimulación con concentraciones crecientes de microorganismo: desde 70 pg/ml utilizando  $2 \cdot 10^5$  UFC/ml de *M. tuberculosis* hasta 2 600 pg/ml con  $2 \cdot 10^7$  UFC/ml de *M. tuberculosis*. En el presente estudio, los niveles de IL-12 obtenidos tras el cocultivo de  $2 \cdot 10^7$  UFC/ml de *H. pylori* dieron lugar a una producción media de 14 600 pg/ml. La metodología utilizada en ambos estudios no fue la misma, ya que en el caso de *M. tuberculosis*, se determinó la presencia de IL-12 total (p70) mientras que para *H.pylori* la cuantificación se realizó mediante la detección de una de sus subunidades, la p40. Es posible que la secreción de esta subunidad en forma libre (biológicamente inactiva) sea la causante de los mayores valores obtenidos en el presente estudio. Aún así, parece factible suponer que *H. pylori* posee una capacidad inductora de esta citoquina igual o superior a la demostrada para *M. tuberculosis*.

## **6.4 Patrones de sensibilidad, métodos de detección y relación con los factores de virulencia analizados:**

### **6. 4. 1) Patrones de sensibilidad:**

Las pautas de tratamiento para erradicar *H. pylori* combinan 2 ó 3 antimicrobianos junto con un compuesto anti-ulceroso (un inhibidor de la bomba de protones o sales de bismuto), que permite modificar el pH del estómago para que actúe el antibiótico. La duración de la terapia habitual es de 7 a 10 días. *H. pylori* es sensible a un gran número de antibióticos *in vitro* pero no todos presentan eficacia *in vivo*. Los antimicrobianos que muestran eficacia clínica y que se utilizan en los tratamientos para erradicar la infección son amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, claritromicina y otros de segunda elección (furazolidona, fluorquinolonas y rifabutina). Pero incluso en aquellos antimicrobianos que muestran eficacia clínica y que se utilizan habitualmente en los tratamientos para erradicar la infección, pueden producirse fracasos terapéuticos. Estos fracasos son debidos, en su mayor parte, al desarrollo de mecanismos de resistencia por parte del microorganismo<sup>235</sup>. Es por ello que, siempre que se considere necesaria la realización de una endoscopia (método diagnóstico invasivo), es recomendable el envío de una biopsia al servicio de microbiología para el estudio de sensibilidad frente a distintos antibióticos. Esto permitirá la correcta elección de antibióticos entre aquellos de probada eficacia clínica y permitirá, al mismo tiempo, conocer los niveles de resistencia de cada comunidad o área geográfica. El tratamiento empírico de pacientes que no requieran la realización de una endoscopia se basará en estos niveles comunitarios<sup>181,236</sup>.

En el presente estudio dos de los antibióticos más frecuentemente utilizados para el tratamiento de la infección por *H. pylori* presentaron los mayores niveles de resistencia:

## DISCUSIÓN

Un 43,59% de aislamientos resultaron resistentes a metronidazol y un 37,18% resistentes a claritromicina.

La resistencia a **metronidazol** es muy variable de unos países a otros, presentando los niveles más elevados en países en desarrollo donde se utiliza en el tratamiento de enfermedades parasitarias y en infecciones ginecológicas<sup>237</sup>. En España los niveles de resistencia han ido aumentando desde porcentajes inferiores al 10% a principios de los 90<sup>238</sup> hasta cifras similares a las obtenidas en el presente estudio: 41,2% en población pediátrica entre 2002 y 2006<sup>239</sup> o un 45% en población general cántabra en el año 2011<sup>240</sup>.

**Claritromicina** es uno de los antibióticos más utilizados para el tratamiento de la infección por *H. pylori*, pero también uno de los que está sufriendo un mayor incremento en sus niveles de resistencia en todo el mundo. Países europeos como Francia, Portugal, Polonia, Turquía y Bulgaria, han sufrido un marcado incremento de la resistencia a claritromicina en los últimos años<sup>191,241,242,243</sup>. Por el contrario en el Norte de Europa no se ha producido este incremento. Esta diferencia probablemente dependa del consumo de macrólidos en los distintos países. Concretamente, en España los nuevos macrólidos fueron comercializados a principios de los años 90 y por supuesto su uso no es exclusivo para el tratamiento de *H. pylori*, más bien al contrario, ya que se realiza un uso notable de estos antimicrobianos en infecciones del tracto respiratorio superior<sup>192</sup>. En el presente trabajo, los niveles de resistencia (37,18%) son similares a los descritos en España para los años 1999 y 2000 (29,16%)<sup>238</sup> pero inferiores a los observados posteriormente entre 2002 y 2006 (56.6 %) <sup>211</sup>. En ambos estudios, el análisis se realizó en población pediátrica, que es precisamente dónde se ha producido un mayor uso de macrólidos en infecciones de tipo respiratorio<sup>181</sup>. Mientras

## DISCUSIÓN

que en el presente estudio la población incluye tanto pacientes pediátricos como adultos, por lo que este hecho tendría un menor impacto.

Estudios realizados en 2011 en Cantabria describen niveles de en torno al 15%<sup>240</sup>.

Durante el período en estudio sólo 4 aislamientos (5%) fueron resistentes frente a **amoxicilina**. Este porcentaje concuerda con lo que se observa en otros estudios españoles<sup>240</sup> y en la mayoría de países europeos aunque se han descrito niveles de hasta el 50% en Rumanía<sup>181</sup> y del 56% en otras regiones como Irán<sup>188</sup>. El principal mecanismo de resistencia descrito se debe a mutaciones en las PBPs, especialmente en la PBP1 codificada por el gen *pbp-1 A*<sup>245</sup>. La reducción de la permeabilidad o la expulsión activa también pueden contribuir a producir una menor sensibilidad al antibiótico.

**Tetraciclina** presentó unos niveles de resistencia muy bajos (un única cepa resistente lo que supone un 1,28%), resultados algo inferiores a los obtenidos en la revisión realizada por De Francesco durante los años 2006-2009<sup>246</sup> donde los niveles europeos se sitúan en torno al 3%, aunque llegan a superar el 40% en África. En este caso el principal mecanismo de resistencia se debe a mutaciones del gen 16S rARN en las posiciones 926, 927 y/o 928<sup>193</sup>, aunque la reducción de permeabilidad parece jugar también un papel importante en la aparición de resistencias.

Frente a los antibióticos de segunda línea, los niveles de resistencia también fueron bajos: menos del 4% para **fluorquinolonas** y del 2% para **rifabutina**.

### **6. 4. 2) Determinación genotípica de mutaciones de resistencia para claritromicina y fluorquinolonas:**

Se determinó el perfil de sensibilidad antibiótica frente a claritromicina y fluorquinolonas mediante métodos fenotípicos y genotípicos para 29 biopsias. En este estudio para el análisis genotípico se utilizó una PCR clásica seguida de una hibridación

## DISCUSIÓN

en fase sólida. Esta técnica se basa en la amplificación de una secuencia diana y su posterior hibridación en tiras de nitrocelulosa marcadas con sondas específicas para diferentes genes de *H. pylori*. La PCR, tanto clásica como a tiempo real, se ha utilizado con éxito para estudiar principalmente la resistencia a claritromicina y fluorquinolonas puesto que se deben a mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr para la primera<sup>247</sup> y 4 mutaciones destacadas en la subunidad A de la ADN girasa para la segunda. Algunos estudios publicados también detectan resistencias frente a otros antibióticos como tetraclinas o rifampicina<sup>166,248</sup>. Previa a la realización de la PCR, se procedió a la digestión del tejido de la biopsia y la extracción del ADN mediante un sistema automático con el que se evitó la excesiva manipulación y se obtuvieron extractos de ADN altamente purificados.

### **6.4.2.1- Claritromicina:**

Los porcentajes de resistencia obtenidos en este trabajo para este antibiótico no fueron iguales por ambos métodos: 37,39% mediante E- test y 48,28% tras PCR. Se observaron 5 casos discrepantes (20,7%):

1 cepa resistente por cultivo no presentaba mutaciones en el gen 23S (posiciones 2142 y 2143) mientras que 4 cepas sensibles en cultivo si mostraron mutaciones en el gen 23S: 2 de ellas presentaban mutaciones del gen 23S ribosomal en la posición 2143 y las otras 2 fueron positivas tanto para el gen mutado como para la forma natural del mismo.

En base a estos resultados se calculó una sensibilidad para la detección de resistencia a claritromicina del 73,33% por el método fenotípico y del 93,33% por el genotípico.

En el caso del aislamiento resistente por cultivo pero sensible por PCR, la explicación más probable es que la resistencia se deba a una mutación menos frecuente localizada una región distinta a la estudiada<sup>249,250,251,252,253</sup>. También es posible que se deba a

## DISCUSIÓN

mecanismos implicados en la permeabilidad o expulsión del antibiótico que no hayan sido descritos hasta el momento.

Para los 2 aislamientos sensibles por Epsilon test, pero con mutaciones del gen 23S ribosomal en la posición 2143, es posible que se trate de una infección mixta por una cepa sensible y otra resistente a claritromicina y en cada una de ellas haya sido detectada por una de las técnicas. Algunos autores han descrito que las cepas resistentes son de crecimiento más lento en cultivo que las cepas sensibles<sup>254</sup>. Esto podría explicar el caso de una infección mixta en la que se detectaría por cultivo sólo la cepa sensible.

Por último, se observaron 2 aislamientos sensibles por cultivo, pero que en el análisis genotípico fueron positivas tanto para el gen mutado como para la forma natural del mismo, esto puede tener 2 posibles explicaciones:

Que la cepa contenga dos copias del operon 23S del RNA ribosómico<sup>190</sup>, una de ellas con la mutación y la otra sin ella que fuera la que se expresará fenotípicamente. O bien, la infección podría estar producida por una cepa sensible y otra resistente al mismo tiempo y al ser las cepas resistentes de crecimiento más lento en cultivo sólo se detectara la sensible por cultivo.

En el presente estudio, los métodos moleculares permitieron además conocer el tipo de mutación concreta que estaba produciendo la resistencia. La mutación que se encuentra más frecuentemente en aislamientos clínicos es la A2143G, seguida de la mutación A2142G y en menor proporción la mutación A2142C<sup>269</sup>.

Todas las cepas detectadas en este trabajo por métodos genotípicos presentaban la mutación A2143G. Una de ellas, además, presentaba una segunda mutación: A2142C.

En conclusión, se puede decir que los métodos moleculares presentan ventajas claras como:

## DISCUSIÓN

-Una mayor rentabilidad que los métodos tradicionales, ya que el cultivo se puede contaminar debido al lento crecimiento del microorganismo. Estudios realizados previamente corroboran la alta rentabilidad de estos métodos<sup>255</sup>.

-La rapidez en la obtención de los resultados acompañados de una alta sensibilidad y especificidad.

-La detección de infecciones mixtas con cepas sensibles y resistentes simultáneamente o infecciones por cepas heterogéneas (cepas con una mutación en una de las dos copias del gen), que pueden pasar desapercibidas por los métodos fenotípicos.

- La fácil interpretación de los resultados respecto al cultivo, cuya visualización no siempre es sencilla.

Como inconveniente destacaría la posibilidad de no detectar aislamientos resistentes por mutaciones distintas a las amplificadas por la PCR.

### **6.4.2.2- Fluorquinolonas:**

Los porcentajes de resistencia para fluorquinolonas si fueron los mismos por ambos métodos: 3,45% mediante E-test y PCR. Pero no correspondían a los mismos aislamientos: se observaron dos aislamientos resistentes, uno detectado por el método fenotípico y otro por el genotípico (por mutación que afecta al codón 91 del gen *gyrA*).

Las causas de estas discrepancias serían las mismas que las expuestas para claritromicina. Serán necesarios estudios con un mayor número de aislamientos resistentes para poder comparar la eficacia de los métodos genotípicos frente al cultivo.

### **6. 4. 3) Relación entre la resistencia, factores propios del paciente y la clínica desarrollada:**

Los dos antibióticos para los que se describen mayores niveles de resistencia son claritromicina y metronidazol. Por este motivo fue en ellos donde se analizó el papel de factores propios de los pacientes y la clínica que padecían.



### **6.4.3.1- Claritromicina:**

Algunos estudios sugieren la asociación de resistencias con diferentes características del paciente como la edad o el género. Concretamente, en el caso de claritromicina, se han descrito distintos niveles de resistencia en función de la edad: los niños presentan tasas de resistencia superiores a las de los adultos en distintos estudios de incluso 40% frente a 17%<sup>211</sup>. Esto puede ser debido a que los niños son tratados frecuentemente con macrólidos en las infecciones del tracto respiratorio, como se ha mencionado anteriormente<sup>256</sup>. Durante el período analizado en este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los patrones de sensibilidad de claritromicina respecto a la edad de los pacientes. El género tampoco resultó un factor determinante. Sin embargo, en los pacientes que habían recibido tratamiento previo para *H. pylori*, los niveles de resistencia fueron significativamente mayores. Probablemente porque el primer tratamiento seleccionó las cepas más resistentes.

Por otro lado, se ha descrito que la gravedad de la inflamación gástrica, la dosis del inhibidor de la bomba de protones utilizada y la patología que produce la infección por *H. pylori* influyen en el éxito del tratamiento con claritromicina<sup>257</sup>. La clínica desarrollada por los pacientes en nuestro estudio no se asoció estadísticamente con los niveles de resistencia obtenidos para claritromicina.

### **6.4.3.2- Metronidazol:**

En el caso de metronidazol las principales diferencias descritas se relacionan más con la situación geográfica que con factores del paciente. Aún así algunos trabajos describen diferencias significativas en función del género<sup>246</sup>: el sexo femenino presentaba porcentajes mayores de resistencia, probablemente por el uso de este antibiótico en infecciones ginecológicas. En el presente estudio, esta diferencia no fue observada.

## DISCUSIÓN

La edad también fue determinante en algunos estudios<sup>258</sup> aunque fue irrelevante para la mayoría<sup>246,259,260</sup>, como también ocurrió en este trabajo.

### **6. 4. 4) Relación entre la resistencia y los factores de virulencia analizados:**

Estudios previos observan diferencias en la sensibilidad a claritromicina y metronidazol<sup>268</sup> entre los distintos genotipos de *H. pylori*. Concretamente describen que las cepas *s2m2-cagA* negativas son más resistentes a claritromicina que las combinaciones alélicas del gen *vacA s1/m1* o *m2* y *cagA* positivas<sup>257,261</sup>. Los pacientes con inflamación e infiltración severa de la mucosa antral se asocian a tasas de curación más elevadas que aquellos que padecen una inflamación moderada<sup>262</sup>. Desde un punto de visto biológico, la presencia del gen *cagA* se asocia con una inflamación gástrica severa<sup>263,264</sup>. Puesto que la inflamación incrementa el flujo sanguíneo, se ha sugerido que este aumento en el riego contribuya a una mejor difusión del antibiótico y por tanto a una mayor sensibilidad *in vivo*<sup>76</sup>. Está hipótesis también resulta válida para las combinaciones alélicas del gen *vacA* distintas a *s2m2*: producen mayores cantidades de toxina, lo que induce una elevada liberación de sustancias mediadoras en los procesos inflamatorios. Este aumento de la inflamación lleva consigo que los antibióticos lleguen mejor a su lugar de acción y se produzca así una más fácil erradicación de estos microorganismos<sup>274</sup>. Otra posibilidad se basa en el hecho de que los aislamientos *cagA* positivos son de crecimiento más rápido que los *cagA* negativos<sup>33,265</sup>. Puesto que los antibióticos actúan durante la división celular, podrían ser más activos sobre las bacterias de rápido crecimiento<sup>43</sup>. Otra posible explicación descrita es que las bacterias *cagA* positivas producen un mayor nivel de citoquinas pro-inflamatorias como IL-8 e IL-1 $\beta$  que las cepas *cagA* negativas. Estas citoquinas pro-inflamatorias son potentes

## DISCUSIÓN

inhibidores del ácido gástrico<sup>266,267</sup>, como consecuencia el ambiente que crean sería menos hostil para la actuación del antibiótico<sup>43</sup>.

Confirmando lo descrito en los estudios citados previamente, en el presente trabajo los aislamientos *vacA s1* y *cagA* positivos fueron significativamente más sensibles que aislamientos con un perfil genético habitualmente descritos como menos virulentos. Se analizó asimismo la relación del número de estos factores y la sensibilidad antibiótica, sin que se observase en este caso ninguna asociación estadísticamente significativa.

## **7. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. La distinta distribución alélica del gen *vacA* en función de la edad, sugiere que las combinaciones consideradas menos virulentas (*s2m2*) sean más habituales en la infancia como primera fase de colonización.
2. Las combinaciones genéticas consideradas menos virulentas se asocian habitualmente con patologías menos graves. Este hecho se ve confirmado al ser la combinación “*s2m2-cagA* negativa” la que presenta una mayor relación con el hallazgo de alteraciones endoscópicas e histológicas de tipo leve: gastritis crónica superficial y/o nodularidad antral.
3. La prevalencia del gen *dupA* fue similar a la descrita en estudios previos (35%). Sin embargo no se observa relación significativa con la edad (a pesar de ser mayor el porcentaje en adultos), origen ni patología. Es posible que el polimorfismo del gen sea la causa de los resultados discrepantes entre los trabajos publicados hasta la fecha.
4. La ausencia simultánea en 4 aislamientos de los genes *homB* y *homA*, ambos implicados en la expresión de proteínas de membrana, es un hecho poco corriente que indicaría que su expresión no es indispensable para la correcta adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica.
5. El gen *jhp0562*, implicado en la síntesis de lipopolisacárido, ha sido recientemente propuesto como nuevo factor de virulencia. Su relación estadísticamente significativa con los factores de virulencia clásicos *vacA* y *cagA* podría confirmar este hecho.
6. El lugar de procedencia del paciente determina el riesgo de ser portador de cepas más o menos virulentas: el número y tipo de factores de virulencia positivos (*cagA* y *jhp0562*) fue mayor en aislamientos de pacientes nacidos en el extranjero. Al mismo tiempo se observó la presencia de factores de

## CONCLUSIONES

virulencia en pacientes con hallazgos endoscópicos e histológicos considerados como leves, lo que refuerza la necesidad de buscar nuevos factores de virulencia.

7. Los niveles de IL-12 obtenidos tras el cocultivo con células mononucleares de sangre periférica no se asociaron con la presencia del gen *dupA* debido, quizá, al polimorfismo de este gen. Sin embargo, los altos niveles de IL-12 obtenidos hacen suponer un importante papel de *H. pylori* como inductor de esta citoquina.
8. Los niveles de resistencia frente a claritromicina fueron mayores en los aislamientos de población autóctona. Este hecho, probablemente debido a su elevado uso en nuestro país para el tratamiento de otras infecciones, junto con las elevadas tasas de resistencia frente a metronidazol, indican la necesidad de evaluar tratamientos alternativos que incluyan antibióticos de segunda elección con mayores tasas de sensibilidad.
9. Las técnicas moleculares de detección de resistencia a claritromicina demostraron ser una alternativa eficaz, con una sensibilidad del 93,33%.
10. Los aislamientos *vacA s1* y *cagA* positivos fueron significativamente más sensibles que aislamientos con un perfil genético habitualmente descritos como menos virulentos. Esto podría deberse a que alteraciones fisiológicas provocadas por estas cepas virulentas favoreciesen la llegada y acción de los antibióticos.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall B, Goodwin C. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Inf J Syst Bacteriol. 1987;37:68.
2. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. Nov. and *Helicobacter mustelae* com. Noc., respectively. Ins Syst Bacteriol. 1989;39:397.
3. Hernández Triana M. *Helicobacter pylori*. La bacteria que más infecta al ser humano. Rev Cubana Aliment Nutr. 2001;15:42-54.
4. Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. J Med Microbiol. 2008;57:545-553.
5. Arachchi HSJ, Kalra V, Lal B, Bhatia V, Baba CS, Chakravarthy S, et al. Prevalence of Duodenal Ulcer-Promoting Gene (*dupA*) of *Helicobacter pylori* in Patients with Duodenal Ulcer in North Indian Population. Helicobacter. 2007;12:591-597.
6. Atherton JC, Martin J. Blaser Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implicationsancient history, modern implications. J Clin Invest. 2009;119:2475-2487.
7. Rappin G. Contribution a l'étude bactéries de la bouche a l'état normal et dans la fièvre typhoid. Parent, Paris, France.
8. Bizzozero G. Ueber die schlauchförmigen drüsen des megendarmkanals und die bazichungen ihres epithels zudem oberfachnepithel der scheimhaur. Arch. F. Mikr. Anat. 1893;42:82-152.
9. Salomon H. Über das spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zuden belegzellen. Zentralbl. Bacteriol, Mikrobiol. Hyg. 1896;19:433.
10. Konturek J W. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. J Physiol. Pharmacol.2003;54:23-41.
11. Doenges JL. Spirochetes in the gastric glands of macacus rhes and humans without definite history of related disease. Proc Soc Exp Med Biol. 1938;38:536-38.
12. Freedberg AS, Barron LE. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. Am J Dig Dis. 1940;7:443-445.



## BIBLIOGRAFÍA

13. Palmer ED. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. *Gastroenterology*. 1954;27:218-20.
14. Steer HW. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol*. 1975;28:639-646.
15. Skirrow MB. *Campylobacter enteritis* “a new disease”. *Br Med J*. 1977;2:9 -11.
16. Marshall B, Royce H, Anner DI. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett*. 1984;25:83-88.
17. Atwood KC. Bacteria, Ulcers, and Ostracism? *H. pylori* and the making of a myth. *Skeptical Inquirer*. 2004;28. Disponible en la dirección web: [http://www.csicop.org/si/show/bacteria\\_ulcers\\_and\\_ostracism\\_h.\\_pylori\\_and\\_the\\_making\\_of\\_a\\_myth/](http://www.csicop.org/si/show/bacteria_ulcers_and_ostracism_h._pylori_and_the_making_of_a_myth/)
18. Borody TJ, Cole P, Noonan S, Morgan A, Lenne J, Hyland L, et al. Recurrence of duodenal ulcer and *Campylobacter pylori* infection after eradication. *Med. J Aust*. 1989;151: 431-5.
19. Trajkow D, Stardelova K, Dimitrova M, Misheuski J, Serafimoski V. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *Prilozi*. 2007;28:25-38
20. Hernández C, Gallón G. Análisis de biopsias gástricas en caninos. *Rev Col Cienc Pec*. 2009;20:250-259.
21. López- Brea M. La Infección por *Helicobacter pylori*: Premio Nobel de Medicina. *Rev Esp Quimioterap*. 2005;18:271-271.
22. Ahmed KS, Khan AA, Ahmed T, Tiwari SK. Impact of household hygiene and water source on prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*. *Singapore Med J*. 2007;48:543-9
23. Talarico S, Gold BD, Fero J, Thompson DT, Guarner J, Czinn S, Salama NR. Pediatric *Helicobacter pylori* Isolates Display Distinct Gene Coding Capacities and Virulence Gene Marker Profiles. *J Clin Microbiol*. 2009;6:1680-1688.
24. Parra T, Carballo F. Reservorios y Vías de Transmisión de la Infección por *Helicobacter pylori*. *Anales Sis San Navarra*. 1998;21:19-26.
25. Hussein Nawfal R. *Helicobacter pylori* and gastric cancer in the Middle East: A new enigma? *World J Gastroenterol*. 2010;16:3226-3234.
26. Vallejos C, Ceda O, Valenzuela M, Toledo H. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori*: clinical and molecular aspects. *Rev Med Chile*. 2003;131:1313-1320.

## BIBLIOGRAFÍA

27. Linz B, Balloux F, Moodley Y, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2007;445:915-918.
28. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 2003;299:1582-5.
29. McClain MS, Shaffer CL, Israel DA, Peek RM, Cover TL. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics*. 2009;10:3.
30. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995;270:17771-17777.
31. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96:12778-12783.
32. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, van Vliet AHM, et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis*. 2006;194:1346-1355.
33. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:14648-14653.
34. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, et al. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999;116:823-30.
35. Tomb J, White O, Kerlavage A, Clayton R, Sutton G. The complete genome sequence of the gastric pathogen *H. Pylori*. *Nature*. 1997;388:539-547.
36. Levine SM, Lin EA, Emara W, Kang J, DiBenedetto M, Ando T, et al. Plastic cells and populations: ADN substrate characteristics in *Helicobacter pylori* transformation define a flexible but conservative system for genomic variation. *FASEB J*. 2007;21:3458-3467.
37. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest*. 2001;107:767-73.

## BIBLIOGRAFÍA

38. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. Nat Rev Microbiol. 2007;5:441-52.
39. Argent RH, Thomas RJ, Aviles-Jimenez F, Letley DP, Limb MC, El-Omar EM, et al. Toxigenic *H.pylori* infection precedes gastric hypochlorhydria in cancer relatives, and *H.pylori* virulence evolves in these families. Clin Cancer Res. 2008;14:2227-2235.
40. Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC. Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. J Med Microbiol. 2008;57:1062-1067.
41. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Science. 2005;96:835-843.
42. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J Biol Chem. 1994; 269:10566-73.
43. Mitsushige S, Yamaoka Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. Arch Immunol Ther Exp. 2009;57:45-56.
44. Ji X, Fernández T, Burroni D, Pagliaccia C, Atherton JC, Reytrat JM et al. Cell Specificity of *Helicobacter pylori* Cytotoxin Is Determined by a Short Region in the Polymorphic Midregion. Infect Immun. 2000;68:3754-3757.
45. Reytrat JMSL, Lupetti P, Bernard M, Pagliaccia C, Pelicic V, Charrel M et al. 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. J Mol Biol. 1999;290:459-470.
46. Torres VJ, McClain MS, Cover, T.L. Interactions between p-33 and p-55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA). J Biol Chem. 2004;279:2324-2331.
47. Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, et al. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. Nat Genet. 2003;33:375-381.
48. De Bernard M, Burroni D, Papini E, Rappuoli R, Telford J, Montecucco C. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. Infect Immun. 1998;66:6014-6016.

## BIBLIOGRAFÍA

49. Garner JA, Cover TL. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun.* 1996;64:4197–4203.
50. De Bernard M, Arico B, Papini E, Rizzuto R, Grandi G, Rappuoli R, Montecucco C. *Mol. Microbiol.* 1997;4:665-674.
51. Czajkowsky DM, Iwamoto H, Cover TL, Shao ZF. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1999;96:2001-2006.
52. Iwamoto H, Czajkowsky DM, Cover TL, Szabo G, Shao Z. VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett.* 1999;450:101-104.
53. Tombola F, Carlesso C, Szabo I, Bernard M, Reyrat JM, Telford JL, Rappuoli R, et al. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys. J.* 1999;76:1401-1409.
54. Tombola F, Oregna F, Brutsche S, Szabo I, Giudice G, Rappuoli R, et al. Inhibition of the vacuolating and anion channel activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett.* 1999;460:221-225.
55. Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, et al. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med.* 1998;187:135-140.
56. Papini E, Satin B, Norais N, Bernard M, Telford JL, Rappuoli R, et al. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Clin Investig.* 1998;102:813-820.
57. Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, et al. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 2000;19:6361-6370.
58. Peek RM Jr., Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishna U, Pietsenpol JA. *Helicobacter pylori* strain specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res.* 1999;59:6124-6131.
59. Cover TL, Krishna U, Israel DA, Peek RM Jr. Induction of Gastric Epithelial Cell Apoptosis by *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. *Cancer Research.* 2003;63:951-957.

## BIBLIOGRAFÍA

60. Rudnicka A, Chimela M. Inflammation and host immune response in *Helicobacter pylori* infections. *Curr Trends Immunol.* 2004;6:1-19.
61. Atherton J. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1997;40:701-703.
62. Pagliaccia C, De Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burroni D, Cover TL, et al. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1998;95:10212-10217.
63. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Hosseini ME, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology.* 2007;133:926-936.
64. Han SR, Schreiber HJ, Bhakdi S, Loos M, and Maeurer MJ. VacA genotypes and genetic diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5:139-145.
65. De Gusmao VR, Nogueira Mendes E, De Magalhaes Queiroz DM, Aguiar Rocha G, Camargos Rocha AM, Ramadan Ashour AA et al. VacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2853-2857.
66. Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut.* 1999;45:499-502.
67. Strobel S, Bereswill S, Balig P, Allgaier P, Sonntag HG, Kist M. Identification and analysis of a new vacA genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1285-1289.
68. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle P, et al. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol.* 1998;36:944-948.
69. Pan ZJ, Berg DE, Hulst WV, Su WW, Raudonikiene A, Xiao SD et al. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct vacA alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis.* 1998;178:220-226
70. Letley DP, Atherton JC. Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. *J Bacteriol.* 2000;182:3278-3280.

## BIBLIOGRAFÍA

71. McClain MS, Cao P, Iwamoto H, Vinion.-Dubiel AD, Szabo G, Z. Shao Z, Cover TL. A 12-Amino-Acid Segment, Present in Type s2 but Not Type s1 *Helicobacter pylori* VacA Proteins, Abolishes Cytotoxin Activity and Alters Membrane Channel Formation. *J Bacteriol.* 2001;183:6499-6508.
72. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. *Gastroenterology.* 1997; 112:92-99.
73. Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC. Determinants of Non-toxicity in the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 2003;278:26734-26741.
74. Moss SF, Malfertheiner P. *Helicobacter* and gastric malignancies. *Helicobacter.* 2007;12:23-30.
75. Go MF, Cissell L, Grayham DY. Failure to confirm association of VacA gene mosaicism with duodenal ulcer disease. *J. Gastroenterol.* 1998;33:132-136.
76. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N, Shiratori Y, Omata M. Structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut.* 1999;44:336–341.
77. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995;55:2111–2115.
78. Covacci A, Telford JL, Del GG, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 1999;284:1328–1333.
79. Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol.* 2003;5:395–404.
80. Joo Tan H, Manaf Rizal A, Rosmadi M, Goh KL. Distribution of *Helicobacter pylori* cagA, cagE and vacA in different ethnic groups in Kuala Lumpur, Malaysia. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:589–594.
81. Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2002;277:6775–8.
82. Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol.* 2002;43:971–80.

## BIBLIOGRAFÍA

83. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*. 2002;295:683–6.
84. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:14428–14433.
85. Neel BG, Gu H, Pao L. The ‘Shp’ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 2003;28:284–93.
86. Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1phase cell cycle machinery. *Bioessays*. 2000;22:818–26.
87. Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA–SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem*. 2003;278:3664–70.
88. Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell*. 2002;10:745–55.
89. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*. 2003;300:1430–4.
90. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 2004;5:1166–74.
91. Brandt S, Kwok T, Hartig R, Konig W, Backert S. NF-κB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:9300–5.
92. Delahay RM, Balkwill GD, Bunting KA, Edwards W, Atherton JC, Searle MS, et al. The highly repetitive region of the *Helicobacter pylori* CagY protein comprises tandem arrays of an alpha-helical repeat module. *J Mol Biol*. 2008;377:956–971.
93. Alm RA, Trust TJ. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med*. 1999;77:834–846.
94. Occhialini A, Marais A, Alm R, Garcia F, Sierra R, Megraud F. Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori*

## BIBLIOGRAFÍA

- strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect Immun.* 2000;68: 6240–6249.
95. Kersulyte D, Velapatino B, Mukhopadhyay AK, Cahuayme L, Bussalleu A, Combe J, et al. Cluster of type IV secretion genes in *Helicobacter pylori*'s plasticity zone. *J Bacteriol.* 2003;185:3764–3772.
  96. Gomes LI, Rocha GA, Rocha AMC, Soares TF, Oliveira CA, Bittencourt PFS, et al. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with dupA-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. *International Int J Med Microbiol.* 2008;298:223–230.
  97. Lu H, Hsu P, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal Ulcer Promoting Gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2005;128:833-848
  98. Argent RH, Burette A, Miendje Deyi VY, Atherton JC. The Presence of dupA in *Helicobacter pylori* Is Not Significantly Associated with Duodenal Ulceration in Belgium, South Africa, China, or North America. *Clin Infect Dis.* 2007;45:1204–6.
  99. Queiroz DM, Rocha GA, Rocha AM, Moura SB, Saraiva IE, Gomes LI, Soares TF, Melo FF, Cabral MM, Oliveira CA. Polimorfismo dupA polymorphisms and risk of *Helicobacter pylori*-associated diseases. *J Med Microbiol.* 2011;30:225-8.
  100. Hussein NR, Argent RH, Marx CK, Patel SR, Robinson K, Atherton JC. *Helicobacter pylori* dupA is polymorphic and its active form induces proinflammatory cytokine secretion by mononuclear cells. *J Infect Dis.* 2010;202:261-9
  101. Beswick E, Suarez G, Reyes V. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2006;12:5599-5605.
  102. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, Voland P, Borén T, Karttunen R, et al. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44:151-156.
  103. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:7533–7538.



## BIBLIOGRAFÍA

104. Nyström J, Svennerholm AM. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine*. 2007;25:2591 – 2598.
105. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S. The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem*. 2005;280:15390-15397.
106. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med*. 2008;47:1077 - 83.
107. Oleastro M, Cordeiro R, Ferrand J, Nunes B, Lehours P, Carvalho-Oliveira I, et al. Evaluation of the Clinical Significance of homB, a Novel Candidate Marker of *Helicobacter pylori* Strains Associated with Peptic Ulcer Disease. *J Infect Dis*. 2008;198:1379-1387.
108. Oleastro M, Cordeiro R, Yamaoka Y, Queiroz D, Mégraud F, Monteiro L, et al. Disease association with two *Helicobacter pylori* duplicate outer membrane protein genes, homB and homA. *Gut Pathogens*. 2009;1:12.
109. Jung SW, Sugimoto M, Graham DY, Yamaoka Y. homB Status of *Helicobacter pylori* as a Novel Marker To Distinguish Gastric Cancer from Duodenal Ulcer. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3241–3245.
110. Bauerfeind P, Garner R, Dunn B, Mobley H. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*. 1997;40:25-30.
111. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*. 2000;287:482–485.
112. Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Physiol*. 2003;65:349–369.
113. Salaun L, Saunders NJ. Population-associated differences between the phase variable LPS biosynthetic genes of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol*. 2006;6:79-90.
114. Oleastro M, Monteiro L, Lehours P, Mégraud F, Ménard A. Identification of Markers for *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Children with Peptic Ulcer Disease by Suppressive Subtractive Hybridization. *Infect Immun*. 2006;74:4064–4074.

## BIBLIOGRAFÍA

115. Oleastro M, Santos A, Cordeiro R, Nunes B, Mégraud F, Ménard A. Clinical Relevance and Diversity of Two Homologous Genes Encoding Glycosyltransferases in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol. 2010;48:2885-2891.
116. Di Lorenzo et al. Subcommittee on chronic abdominal pain. Chronic Abdominal pain in children. Pediatrics. 2005;115:370-381.
117. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature. 2000;404:398-402.
118. Queiroz DM, Bittencourt P, Guerra JB, Rocha AM, Rocha GA, Carvalho AS. IL1RN polymorphism and cagA-positive *Helicobacter pylori* strains increase the risk of duodenal ulcer in children. Pediatr Res. 2005;58:892-896.
119. Gamez Escalona M, Mulet Pérez A, Borrero Comas J. Gastritis Crónica Antral por *Helicobacter pylori*. Corr Med Holg. 2005; 9: Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no92/ind92.htm>
120. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1994;1:1311-1315.
121. Khulusi S, Badve S, Patel P, Lloyd R, Marrero JM, Finlayson C, et al. Pathogenesis of gastric metaplasia of the human duodenum: role of *Helicobacter pylori*, gastric acid, and ulceration. Gastroenterology. 1996;110:452-458.
122. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin. Invest. 2004;113:321-333.
123. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer. 2001;37:S4-S66.
124. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. Br Med J. 1991;302:1302-1305.
125. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, et al. *Helicobacter pylori* and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med. 1991;325:1127-1131.

## BIBLIOGRAFÍA

126. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med. 1991;325:1132-1136
127. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med. 2001;345:784-789.
128. Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, Samuelson LC, Merchant JL. Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. Gastroenterology. 2002;122:119-133.
129. Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, et al. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. Gastroenterology. 2000;118:36-47.
130. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008;105:1003-1008.
131. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature. 1998;392:402-405.
132. Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE et al. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. JAMA. 2004;291:187-194.
133. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori* associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet. 1991;338:1175-1176.
134. Wright DH, Isaacson PG. Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. Cancer. 1983;52:1410-1416 .
135. Fukui T, Okazaki K, Tamaki H, Kawasaki K, Matsuura M, Asada M et al. Inmonogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. Lab Invest. 2004;84:485-492.

## BIBLIOGRAFÍA

136. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1993;342:575-577.
137. Sanz de Villalobos E, Boixeda de Miquel D. *Helicobacter pylori* y enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Anales Sis San Navarra*. 1998;21:37-44.
138. Alakkari A, Zullo A, O'Connor HJ. *Helicobacter pylori* and nonmalignant diseases. *Helicobacter*. 2011;16:33-37.
139. Prelipcean CC, Mihai C, Gogalniceanu P, Mitrica D *et al*. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Rev Med Chir Soc Med Nat Isai*. 2007;111:575-583
140. Marignani M, Angeletii S, Bordi C. Reversal of long-standing iron deficiency anaemia after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol*. 1997;32:617-622.
141. Annibale B, Marignani M, Monarca B, Antonelli G, Marcheggiano A, Martino G, Mandelli F, Caprilli R, Delle Fave G. Reversal of iron deficiency anemia after *Helicobacter pylori* eradication in patients with asymptomatic gastritis. *Ann. Intern. Med*. 1999;131:668–672.
142. Kaptan K, Beyan C, Ural AU, Cetin T, Avcu F, Gülşen M, et al. *Helicobacter pylori*—is it a novel causative agent in Vitamin B12 deficiency? *Arch. Intern. Med*. 2000;160:1349–1353.
143. Choe YH, Oh YJ, Lee NG, Imoto I, Adachi Y, Toyoda N, Gabazza EC. Lactoferrin sequestration and its contribution to iron-deficiency anemia in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J.Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:980-985.
144. Emilia G, Luppi M, Zucchini P, Morselli M, Potenza L, Forghieri F, Volzone F, Jovic G, Leonardi G, Donelli A, Torelli G. *Helicobacter pylori* infection and chronic immune thrombocytopenic purpura: long-term results of bacterium eradication and association with bacterium virulence profiles. *Blood*. 2007;110:3833-3841.
145. Bruce MG, Maaroos HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2008;13:1 - 6.
146. Osawa H. Ghrelin and *Helicobacter pylori* infection. *World J astroenterol*. 2008;14: 6327-6333.

## BIBLIOGRAFÍA

147. Weigt J, Malfertheiner P. Influence of *Helicobacter pylori* on gastric regulation of food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12: 522 -525.
148. Cuevas Acuña MT, López García AI, Paz Martínez D, Galindo García JA, Papaqui Tapia S, Garza Yado ML, et al. Frequency of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic urticaria of Puebla University Hospital. *Rev Alerg Mex*. 2006;53:174 -178.
149. Park SJ, Shin JI. The role of interleukin 10 in the prevention of allergic asthma in mouse models with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Invest*. 2011;121:3088–3093.
150. Guiney DG, Hasegawa P, Cole SP. *Helicobacter pylori* Preferentially Induces Interleukin 12 (IL-12) Rather than IL-6 or IL-10 in Human Dendritic Cells. *Infection and Immunity*. 2003;71:4163–4166.
151. Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, Niedobitek G, Lochs H, Schreiber S. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. *Clin Exp Immunol*. 1999;117:316–323.
152. Hida N, Shimoyama Jr T, Neville P, Dixon MF, Axon ATR, Shimoyama T, Crabtree JE. Increased expression of IL- 1 0 and IL- 1 2 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial cag status and peptic ulceration. *J Clin Pathol*. 1999;52:658-664.
153. Junzo H, Nakayama M, Isomoto H, Kurazono H, Mukaida N, Mukhopadhyay AK, et al. Molecular Characterization of *Helicobacter pylori* VacA Induction of IL-8 in U937 Cells Reveals a Prominent Role for p38MAPK in Activating Transcription Factor-2, cAMP Response Element Binding Protein, and NF-B Activation1. *J Immunol*. 2008;180;5017-5027.
154. Akhiani A, Pappo J, Kabok Z, Schön K, Gao W, Franzen LE, Lycke N. Protection Against *Helicobacter pylori* Infection Following Immunization Is IL-12-Dependent and Mediated by Th1 Cells. *J Immunol*. 2002;169;6977-6984.
155. Del Prete G. The concept of type-i and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol*. 1998;16:427-55.
156. Trinchieri G. Interleukin-1 2: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:251-76.
157. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-90.

## BIBLIOGRAFÍA

158. Navaglia F, Basso D, Zambon CF, Ponzano E, Caenazzo L, Gallo N, et al. Interleukin 12 gene polymorphisms enhance gastric cancer risk in *H pylori* infected individuals. *J Med Genet* 2005;42:503–510.
159. De Jonge R, Kuipers EJ, Langeveld SCL, Loffeld, RJLF, Stoof J, van Vliet AHM, Kusters JG. The *Helicobacter pylori* plasticity region locus jhp0947–jhp0949 is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;41:161–167.
160. López-Brea M, Alarcón T, Baquero M, Domingo D, Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2004. SEIMC.
161. Steven J, Czinn MD. *Helicobacter pylori* infection: Detection, investigation and management. *J Pediatr.* 2005;146: 21-26.
162. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement *M100-S17*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
163. Potter HV, Loffeld RJ, Stobbering HE. Rapid Staining of *Campylobacter pyloridis*. *Histopathology.* 1987;11:1223.
164. Naumov I, Fenjvesi A. Correlation between rapid urease test and pathohistological gastrobiopsy finding with positive immunological test in detecting *Helicobacter pylori* infection. *Med Pregl.* 2011 Jul-Aug;64:413-417.
165. Alarcón T, Vega E, Domingo D et al. Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from children: Prevalence and Study of Mechanism of Resistance by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 486-88.
166. Lawson AJ, Elviss NC, Owen RJ. Real time PCR detection and frequency of 16S rADN mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:282-286.
167. Simala-Grant JL, Taylor DE. Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. *APMIS.* 2004;112:886-897.
168. Woo HY, Park D, Park H, Kim M, Kim D, Kim IS. Dual Priming Oligonucleotide base multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and

## BIBLIOGRAFÍA

- determination of clarithromycin resistance with Gastric Biopsy Specimens. *Helicobacter*. 2009;14:22-28.
169. Stone G, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J, Flamm R, Graham D, Ghoneim A, and Tanaka K. A PCR-Oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23 S RNAr gene mutations in Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:712-714.
  170. Doorn LJ, Glupczynski Y, Kuster JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, et al. Accurate Prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by PCR Line Probe Assay for detection of mutations in the 23 S RNAr gene: Multicenter Validation Study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1500-1504.
  171. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut*. 2002;50:285-289.
  172. Achtman M, Azuma T, Douglas E. Berg, Ito Y, Morelli G, Pan Z, Suerbaum S, et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Molecular Microbiology*. 1999;32:459-470.
  173. López-Brea M, Alarcón T, Domingo D, Sánchez I, Martínez MJ, Sanz JC. Evaluación de una técnica de western-blot (Helicoblot 2.0) para la detección de anticuerpos frente a antígenos específicos de *Helicobacter pylori* en niños. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1998;16:275-279.
  174. Andrews J, Marsden B, Brown D, Wong VS, Wood E, Kelsey M. Comparasion of three stool antigen tests for *Helicobacter pylori* detection. *J Clin Pathol*. 2001;56:769-771.
  175. Falsafi T, Walizadh N, Sepehr S, Najafi M. Application of a stool antigen test to evaluate the incidence of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents from Tehran, Iran. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:1094-1097.
  176. Raguza D, Granato CFH, Kawakami E. Evaluation of the stool antigen test for *Helicobacter pylori* in children and adolescents. *Dig Dis Sci*. 2005;50:453-457.
  177. Shaikh S, Khaled MA, Islam A, Kurpad AV, Mahalanabis D. Evaluation of stool antigen test for *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children from a developing country using 13C-urea breath test as a standard. *J Pediatric gastroenterol Nutr*. 2005;40:552-554.
  178. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007;56:772-781.

## BIBLIOGRAFÍA

179. Alarcón T, Martínez MJ, Madruga D, Domingo D, López-Brea M. One week vs two weeks triple therapy in paediatric patients: Impact of treatment duration and metronidazole resistance. *Rev Esp Quimioterapia*. 2000;13:55.
180. Oderda G, Shcherbakov P, Bontems P, Urruzuno P, Romano C, Gottrand F *et al*. Results from the pediatric European register for treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2007;12:150-156.
181. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advantages in testing. *Gut*. 2004;53:1374-1384.
182. Peterson WL, Graham DY, Marshall B, Blaser MJ, Genta RM, Klein PD *et al*. Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori*: a randomized, double blind trial. *Am J Gastroenterol*. 1993;88:1860-1864.
183. McColl Kel, El Omar E, Gillen D. Interactions between *H. pylori* infection, gastric acid secretion and anti-secretory therapy. *Br Med Bull*. 1998;54:121-138.
184. Lind T, Mégraud F, Uge P, *et al*. The MACH 2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology*. 1999;116:248-253.
185. Laine L, Fennerty B, Osato M, Sugg J, Suchower L, Probst P *et al*. Esomeprazole-based *Helicobacter pylori* eradication therapy and the effect of antibiotic resistance: results of three US multicenter, double-blind trials. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:3393-3398.
186. Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Antibiotics resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Intern J Antimicrob Agents*. 1999;12:19-26.
187. Domingo D, Alarcón T, Vega AE, García JA, Martínez MJ, López-Brea M. Factores microbiológicos que afectan a la erradicación de *Helicobacter pylori* en población adulta y pediátrica. *Enferm Infecc Microb Clin*. 2002;20:431-434.
188. Rafeey M, Ghotaslou R, Nikvash S, Hafez AA. Primary resistance in *Helicobacter pylori* isolated from Iran. *J Infect Chemother*. 2007;13:291-295.
189. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Correlation between substitutions in penicillin binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*. 2007;51:939-944.
190. Taylor D, Zhongming G. Cloning and Sequence Analysis of Two Copies of a 23S rRNA Gene from *Helicobacter pylori* and Association of Clarithromycin



## BIBLIOGRAFÍA

- Resistance with 23S rRNA Mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2621-2628.
191. Glupczynski Y, Mégraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20:820-823.
192. López-Brea M, Domingo D, Sánchez I, Alarcón T. Evolution of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates from Spain. *J Antimicrobial Chemother.* 1997;40:279-281.
193. Pajares García JM, Pajares-Villarroya R. *Helicobacter pylori* resistencia a los antibióticos. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007;99:63-70.
194. Fujimura S, Kato S, Inuma K, Watanabe A. In vitro activity of fluoroquinolone and the *gyrA* gene mutation in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. *J Med Microbiol.* 2004;53:1019-1022.
195. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:280-322.
196. Versalovic J, Osato M. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:283-286.
197. McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P, McColl K, Price A, Smith G, Teare L, PHLS Helicobacter Working Group. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemther.* 2002;49:601-609.
198. Alarcón T, Martínez MJ, Urruzuno P, Cilleruelo ML, Madruga D, Sebastián M, *et al.* Prevalence of CagA and VacA Antibodies in children with *Helicobacter pylori* associated peptic ulcer compared to prevalence in pediatric patients with active or nonactive chronic gastritis. *Clin Diag Lab Immunology.* 2000;7:842-844.
199. Cibrelus LA, Pérez de Ayala A, Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, López-Brea M. In vitro efficiency of ciprofloxacin and rifampicin as potential second line treatment in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Helicobacter.* 2006;11:402-403.
200. Dunn, BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997;10:720-741.
201. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:63-96.

## BIBLIOGRAFÍA

202. Sheu SM, Hung KH, Sheu BS, Yang HB, Wu JJ. Association of Nonsynonymous Substitutions in the Intermediate Region of the *vacA* Gene of *Helicobacter pylori* with Gastric Diseases in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2009;47:249-251.
203. Ogura, K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* 2000;192:1601-1610.
204. Forsyth MH, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.* 1998;66:3088-3094.
205. Dabiri H, Maleknejad P, Yamaoka Y, Feizabadi MM, Jafari F, Rezadehbashi M, et al. Distribution of *Helicobacter pylori* *cagA*, *cagE*, *oipA* and *vacA* in different major ethnic groups in Tehran, Iran. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:1380–1386.
206. Jones KR, Joo YM, Jang S, Yoo YJ, Lee HS, Chung IS, et al. Polymorphism in the *CagA* EPIYA Motif Impacts Development of Gastric Cancer. *J Clin Microbiol.* 2009;47:959–968
207. Homan M, Luzar B, Kocjan BJ, Orel R, Močilnik T, Shrestha M, Kveder M, Poljak M. Prevalence and clinical relevance of *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from Slovenian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49:289-296.
208. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *babA* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2006;11:574-580.
209. Thjodleifsson B, Asbjörnsdóttir H, Sigurjonsdóttir RB, Gíslason D, Olafsson I, Cook E, Gíslason T, Jogi R, Janson C. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* and *cagA* antibodies in Iceland, Estonia and Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2007;39:683-689.
210. Díaz-Reganon J, Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Susceptibility of 36 *Helicobacter pylori* clinical isolates to four first-line antibiotics and virulence factors. *Rev Esp Quimioter.* 2006;19:34-38.
211. Agudo S, Pérez-Pérez G, Alarcón T, López-Brea M. High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Strains and Risk Factors

## BIBLIOGRAFÍA

- Associated with Resistance in Madrid, Spain. J Clin Microbiol. 2010;48:3703-3707.
212. Miehlke S, Kibler K, Kim JG, Figura N, Small SM, Graham DY, Go MF. Allelic variation in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States. Am. J. Gastroenterol. 1996;91:1322–1325.
213. Karita M, Blaser MJ. Acid tolerance response in *Helicobacter pylori* and differences between *cagA*+ and *cagA*- strains. J Infect Dis. 1998;178:213-219.
214. Qiao W, Hu J, Xiao B, Wu K, Peng D, Atherton J, Xue H. CagA and vacA of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. World J Gastroenterol. 2003;8:1762 – 1766.
215. Alarcón T, Domingo D, Martinez MJ, López-Brea M. *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. FEMS Immunol Med Microbiol. 1999;24:215-219.
216. Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, Liu W, Lu H. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, *dupA* in China. BMC Gastroenterology. 2008;8:49
217. Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley DP, Muhammad MK, et al. Differences in Virulence Markers between *Helicobacter pylori* Strains from Iraq and Those from Iran: Potential Importance of Regional Differences in *H. pylori*-Associated Disease. J Clin Microbiol. 2008;46:1774-1779.
218. Douraghi M, Mohammadi M, Oghalaie A, Abdirad A, Mohagheghi MA, Hosseini ME, et al. *dupA* as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. J Med Microbiol. 2008;57:554-562.
219. Schmidt HM, Andres S, Kaakoush NO, Engstrand L, Eriksson L, Goh KL, et al. The prevalence of duodenal ulcer promoting gen (*dupA*) in *Helicobacter pylori* isolate varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case control study. Gut Pathog. 2009;1:5.
220. Shiota S, Matsunari O, Watada M, Hanada K, Yamaoka Y. Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori* *dupA* gene and clinical outcomes. Gut Pathog. 2010;2:13.
221. Hussein NR. The association of *dupA* and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29:817-821.

## BIBLIOGRAFÍA

222. Queiroz DM, Moura SB, Rocha AM, Costa RF, Anacleto C, Rocha GA. The genotype of the Brazilian dupA-positive *Helicobacter pylori* strains is dupA1. J Infect Dis. 2011;203:1033-1034.
223. Oleastro M, Cordeiro R, Ménard A, Gomes JP. Allelic Diversity among *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein Genes homB and homA Generated by Recombination. J Bacteriol. 2010; :3961-3968.
224. Oleastro M, Cordeiro R, Ménard A, Yamaoka Y, Queiroz D, Mégraud F, Monteiro L. Allelic diversity and phylogeny of homB, a novel co-virulence marker of *Helicobacter pylori*. BMC Microbiol. 2009;9:248.
225. Vitoriano I, Saraiva-Pava KD, Rocha-Gonçalves A, Santos A, Lopes AI, Oleastro M, Roxo-Rosa M. Ulcerogenic *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Children: A Contribution to Get Insight into the Virulence of the Bacteria. PLoS One. 2011;6:e26265.
226. Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* Persistence: an Overview of Interactions between *H. pylori* and Host Immune Defenses. Clin Microbiol Rev. 2006;19:597-613.
227. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science. 1998;279:373-377.
228. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, et al. N. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 1998;28:37-53.
229. Guillemin K, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002;99:15136–15141.
230. Mueller A, Merrell DS, Grimm J, Falkow S. Profiling of microdissected gastric epithelial cells reveals a cell type-specific response to *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 2004;127:1446–1462.
231. Segal ED, Lange C, Covacci A, Tompkins LS, Falkow S. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997;94:7595-7599.
232. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat. Rev. Microbiol. 2005;3:320-332.

## BIBLIOGRAFÍA

233. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nat. Rev. Cancer. 2004;4:688-694.
234. Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. Cell. Microbiol. 2002;4:677-690.
235. López-Brea M, Alarcón T. Sensibilidad a los antimicrobianos en la infección por *Helicobacter pylori*. En: López-Brea M, ed. *Helicobacter pylori*: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento. Barcelona: Prous Science; 1999. p. 281-305.
236. Kobayashi I, Murakami K, Kato M, Kato S, Azuma T, Takahashi S, et al. Changing antimicrobial susceptibility epidemiology of *Helicobacter pylori* strains in Japan between 2002 and 2005. J Clin Microbiol. 2007;45:4006-4010.
237. John Albert M, Al-Mekhaizeem K, Neil L, Dhar R, Dhar PM, Al- Ali M, et al. High prevalence and level of resistance to metronidazole, but lack of resistance to other antimicrobials in *Helicobacter pylori*, isolated from a multiracial population in Kuwait. Aliment Pharmacol Ther. 2006;24:1359-66.
238. López-Brea M, Martínez J, Domingo D, Alarcón T. A 9 year study of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* from Spanish children. J Antimicrob Chemother. 2001;48:295 - 297.
239. Agudo S, Alarcón T, Cibrelus L, Urruzuno P, Martínez M, López-Brea M. High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates obtained from Spanish children. Rev Esp Quimioter. 2009;22:88 - 92.
240. Cuadrado-Lavín A, Salcines-Caviedes JR, Carrascosa MF, Mellado P, Monteagudo I, Llorca J, et al. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to six antibiotics currently used in Spain. J Antimicrob Chemother. 2011;67:170-173.
241. Koletzko S, Richy F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. Gut. 2006;55:1711 - 1716.
242. Boyanova L, Nikolov R, Lazarova E, Gergova G, Katsarov N, Kamburov V, et al. Antibacterial resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Bulgarian children and adult patients over 9 years. J Med Microbiol. 2006;55:65-68.

## BIBLIOGRAFÍA

243. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Burattini O. Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. J Antimicrobial Chemother. 2007;59:783-785.
244. Ilie M, Popa M, Chifiriuc MC, Baltac A, Constantinescu G, Tănăsescu C. *Helicobacter pylori* cultivation from gastric biopsies and susceptibility to antibiotics used in empirical therapy. Roum Arch Microbiol Immunol. 2011;70:60-64.
245. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clin Microbiol Rev. 2007;20:280–322.
246. De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, et al. Worldwide *H. pylori* Antibiotic Resistance: a Systematic Review. J Gastrointest Liver Dis. 2010;19:409-414.
247. López-Brea M, Alarcón T. Novel Real Time PCR for Detection of Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. Helicobacter. 2006;11:400.
248. Chisholm SA, Owen RJ. Frequency and molecular characteristics of ciprofloxacin and rifampicin-resistant *Helicobacter pylori* from gastric infections in the United Kingdom. J Med Microbiol. 2009;58:1322-1328.
249. Hao Q, Li Y, Zhang Z, Liu Y, Gao H. New mutation points in 23S RNAr gene associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in northeast China. World J Gastroenterol. 2004;10:1075-1077.
250. Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA, Pietroiusti A, Galante A, Favalli C. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 2002;46:3765-69.
251. Rimbara E, Kawai T, Sasatsu M. Novel mutation in 23S RNAr that confers Low-Level Resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:3465-3466.
252. Kim JM, Kim JS, Kim N, Kim YJ, Kim IY, Chee YJ, et al. Gene mutations of 23S RNAr associated with Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Korean Patients. J Microbiol Biotechnol. 2008;18:1584-1589.
253. Francesco V, Zullo A, Ierardi E, Vaira D. Minimal inhibitory concentration (MIC) values and different point mutations in the 23S RNAr gen for

## BIBLIOGRAFÍA

- clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Dig Liver Dis. 2009;41:610-611.
254. Wang G, Taylor DE. Site specific mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptograminA antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:1952-1958.
255. Chisholm SA, Owen RJ. Application of polymerase chain reaction-based assays for rapid identification and antibiotic resistance screening of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;61:67-71.
256. Perez Aldana L, Kato M, Nakagawa S, Kawarasaki M, Nagasako T, Mizushima T, et al. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance. Helicobacter. 2002;7:306-309.
257. Domingo D, Alarcón T, Prieto N, López-Brea M. Relationship between antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. Rev Esp Quimioter. 1999;12:340-345.
258. Boyanova L, Ilieva J, Gergova G, Davidkov L, Spassova Z, Kamburov V, et al. Numerous risk factors for *Helicobacter pylori* antibiotic resistance revealed by extended anamnesis: a Bulgarian study. J Med Microbiol. 2011;61:85-93.
259. Sun QJ, Liang X, Zheng Q, Gu WQ, Liu WZ, Xiao SD, Lu H. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics from 2000 to 2009 in Shanghai. World J Gastroenterol. 2010;16:5118-5121.
260. Boyanova L, Ilieva J, Gergova G, Spassova Z, Nikolov R, Davidkov L, et al. Evaluation of clinical and socio-demographic risk factors for antibacterial resistance of *Helicobacter pylori* in Bulgaria. J Med Microbiol. 2009;58:94-100.
261. Elviss N, Owen RJ, Xerry J, Walker A, Davies K. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. J Antimicrob Chemother. 2004;54:435-440.
262. Zanten SJ, Bradette M, Farley A et al. The DU-MACH study: eradication of *Helicobacter pylori* and ulcer healing in patients with acute duodenal ulcer using omeprazole based triple therapy. Aliment Pharmacol Ther. 1999;13:289-295.
263. Francesco V, Zullo A, Margiotta M. Sequential treatment for *Helicobacter pylori* does not share the risk factors of triple therapy failure. Aliment Pharmacol Ther. 2004;19:407-414.

## BIBLIOGRAFÍA

264. van der Hulst RW, Weel JF, Verheul SB et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection with low or high dose omeprazole combined with amoxycillin and the effect of early retreatment. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996;10:165–171
265. van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N et al. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut.* 2000;46:321-332.
266. Kondo S, Shinomura Y, Kanayama S, Kawabata S, Miyazaki Y, Imamura I et al. Interleukin-1 beta inhibits gastric histamine secretion and synthesis in the rat. *Am J Physiol.* 1994;267:G966–971
267. Wolfe MM, Nompleggi DJ. Cytokine inhibition of gastric acid secretion-a little goes a long way. *Gastroenterology.* 1992;102:2177–2178
268. López-Brea M, Martínez MJ, Domingo D, Sánchez I, Alarcón T. Metronidazole resistance and virulence factors in *Helicobacter pylori* as markers for treatment failure in a paediatric population. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;24:404-409.
269. Domingo D, Alarcón T, Sanz JC, Sánchez I, López-Brea M. High frequency of mutations at position 2144 of the 23S rRNA gene in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains isolated in Spain. *J Antimicrobial Chemother.* 1998;40:573-574.
270. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1680-1687.
271. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, et al. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut.* 1998;42:338-343.
272. Sanz-Pelaez O, Santana-Rodriguez E, Maroto AA, Carranza-Rodriguez C, Pisos-Alamo E, Perez-Arellano JL. *Helicobacter pylori* and *cagA* seroprevalence in sub-Saharan immigrants recently. *Scand J Infect Dis.* 2008;40:756-758.
273. Al-Ghoul L, Wessler S, Hundertmark T, Krüger S, Fischer W, Wunder C, et al. Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322:860-866.



## BIBLIOGRAFÍA

274. van Doorn LJ, Quint W, Schneeberger P, Tytgat GM, de Boer WA. The only good *Helicobacter pylori* is a dead *Helicobacter pylori*. Lancet. 1997;350:71-72.
275. Fulton SA, Johnsen JM, Wolf SF, Sieburth DS, Boom WH. Interleukin-12 production by human monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis: role of phagocytosis. Infect Immun. 1996;64:2523-2531.
276. Gatta L, Perna F, Figura N, Ricci C, Holton J, D'Anna L, et al. Antimicrobial activity of esomeprazole versus omeprazole against *Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother. 2003;51:439-42.
277. Glocker E, Bogdan C, Kist M. Characterization of rifampicin-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. J Antimicrob Chemother. 2007;59:874-879.